

Samantha Cristiane Lopes

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E O  
EFEITO DE  $\beta$ -BLOQUEADORES NAS DISCINESIAS  
INDUZIDAS POR L-DOPA EM UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel  
Schröder Prediger

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo  
Naoto Takahashi

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Samantha Cristiane

Envolvimento do sistema noradrenérgico e o efeito de B-bloqueadores nas discinesias induzidas por L-DOPA em um modelo animal da doença de Parkinson / Samantha Cristiane Lopes ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger ; coorientador, Reinaldo Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC, 2015.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. Discinesias induzidas por L-DOPA. 4. Sistema noradrenérgico. 5. Antagonistas B-adrenérgicos. I. Prediger, Rui Daniel Schröder. II. Takahashi, Reinaldo Naoto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Samantha Cristiane Lopes

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E O  
EFEITO DE  $\beta$ -BLOQUEADORES NAS DISCINESIAS  
INDUZIDAS POR L-DOPA EM UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 28 de agosto de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Thereza Christina Monteiro de Lima, Dr.<sup>a</sup>

Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> xxxx, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade xxxx

---

Prof.<sup>a</sup> xxxx, Dr.<sup>a</sup>  
Corientadora  
Universidade xxx



Este trabalho é dedicado à minha avó, Helga, que me fez perceber o  
quão pequeno são nossos problemas e quão grandioso Deus é.  
À ela, minha eterna gratidão e amor.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e demonstrar sua grandiosidade em meio aos erros cometidos. Por sussurrar “não desista, o melhor ainda está por vir”.

Aos meus pais, Roseli e Pedro, por me fazerem, acreditar, querer e lutar pelo o que desejo, sendo exemplos reais de que sonhos podem se tornar realidade dessa forma. Aos meus irmãos, Mark William e Sula, àqueles que me tornam uma pessoa melhor e me inspiram para prosseguir determinada, desejo um dia ser a metade do que vocês são. Aos meus cunhados, Djony e Djulia, pelo apoio recebido. À toda minha família que, com muita união e amor, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger, por acreditar abrir as portas de seu laboratório para mim. Sou grata pela oportunidade que me concedeu durante os últimos seis anos, possibilitando-me de fazer o que gosto e me tornando ainda mais apaixonada pela ciência, obrigada por todo o apoio e ensinamentos durante esse tempo. Ao Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, por aceitar ser meu co-orientador e por ceder espaço no seu laboratório para que parte deste trabalho tenha se concretizado. Ao Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal do Departamento de Bioquímica da UFSC, pelas oportunidades de colaboração e enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos, muito mais que colegas, do LEXDON: Ana Elisa, Ana Cristina, Andréia, Angela, Fernanda, Filipe, Josiel, Marissa, Paulo, Stella e Tuane. Àqueles que me tornaram uma verdadeira aluna de iniciação científica: Aderbal, Daniel e Sandro. E aos amigos que os corredores e as bancadas trouxeram: Ana Paula, Filipe, Flora, Lucas e Marina. Pelo companheirismo no ambiente de trabalho e aprendizado compartilhado.

Às amigas de uma vida, Amábily e Raiany, por estarem ao meu lado desde sempre. À Ana Cláudia, Caroline Pscheidt, Caroline Cavalleri, Danielle, Franci Ellen, Nara, Nathália e Marijú, sou grata pelo companheirismo durante a graduação e amizade que segue após ela.

Ao CNPq, CAPES, FAPESC e ao Departamento de Farmacologia/UFSC pelo suporte financeiro.





*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”*  
Eleanor Roosevelt



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) caracteriza-se pela perda lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta e pela presença dos corpos de Lewy. A reposição de dopamina com a administração oral do seu precursor L-DOPA representa a principal alternativa farmacológica para o tratamento paliativo dos sintomas motores (bradicinesia, tremores de repouso e rigidez muscular) da DP. Todavia, 90% dos pacientes tratados durante 10 anos com L-DOPA desenvolvem efeitos colaterais que incluem discinesias e flutuações liga-desliga. Os mecanismos moleculares exatos associados ao desenvolvimento das discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs) permanecem desconhecidos, entretanto, alguns estudos indicam o envolvimento do sistema noradrenérgico e o potencial de fármacos  $\beta$ -bloqueadores como antidiscinéticos. No presente estudo foi investigado o envolvimento da neurodegeneração noradrenérgica, associada à degeneração dopaminérgica, e a modulação exercida por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos no aparecimento e desenvolvimento das LIDs em ratos infundidos com a neurotoxina catecolaminérgica, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), unilateralmente no feixe prosencefálico medial. A avaliação dos movimentos anormais involuntários (AIMs), durante o tratamento crônico com a L-DOPA, demonstrou que a degeneração noradrenérgica associada à degeneração dopaminérgica antecipa e amplia a severidade das LIDs. Enquanto, lesões induzidas com 6-OHDA com a administração prévia de desipramina ou nomifensina, majoritariamente lesões dopaminérgicas ou noradrenérgicas, respectivamente; apresentaram menores escores de LIDs, assim como AIMs de locomoção. Em um protocolo de indução das discinesias com interrupção do tratamento, a retomada da L-DOPA associada ao pré-tratamento com o antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol reduziu as discinesias em ratos hemiparkinsonianos duplamente desnervados. A eficácia da L-DOPA sob a função motora foi avaliada pelo teste do cilindro, campo aberto e rota-rod; sendo que a amantadina e o propranolol não prejudicaram a sua atividade antiparkinsoniana frente à lesão com 6-OHDA. Em conjunto, estes resultados sugerem que o sistema noradrenérgico é um importante modulador das LIDs e apresenta novas evidências do potencial antidiscinético de antagonista  $\beta$ -adrenérgicos na DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson 1. L-DOPA 2. Discinesias 3. Sistema noradrenérgico 4. Antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos 5.



## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the presence of Lewy bodies. The replacement of dopamine with the precursor L-DOPA through oral administration is the major pharmacological alternative to the palliative treatment of motor symptoms (bradykinesia, resting tremors and muscular rigidity) of PD. However, 90% of patients treated for 10 years with L-DOPA develop side effects, which include dyskinesia and on-off fluctuations. The exact molecular mechanisms involved in development of L-DOPA-induced dyskinesias (LIDs) remain unknown; moreover, some studies indicate the involvement of the noradrenergic system and the potential for  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists as antidyskinetic agents. In this study it was investigated the involvement of noradrenergic neurodegeneration associated with dopaminergic degeneration, and the modulation carried out by  $\beta$ -adrenergic antagonists in the appearance and development of LIDs in rats infused with the catecholaminergic neurotoxin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), unilaterally in the medial forebrain bundle. Evaluation of abnormal involuntary movements (AIMs) during chronic treatment with L-DOPA demonstrated that noradrenergic degeneration associated with dopaminergic degeneration cause early effects and increases the severity of LIDs. While injuries with use of desipramine or nomifensine, mostly dopaminergic or noradrenergic lesions, respectively; had lower scores of LIDs, as well as abnormal movements of locomotion. In a protocol of dyskinesias with discontinuation of therapy, the retake of L-DOPA associated with pretreatment with the  $\beta$ -adrenergic antagonist propranolol reduced dyskinesias in hemiparkinsonian rats doubly denervated. The L-DOPA efficacy in motor function was evaluated by the cylinder, open field and rota-rod tests; neither amantadine nor propranolol disrupted the antiparkinsonian activity of L-DOPA. Taken together, these results suggest that the noradrenergic system modulates LIDs and provide new evidence of the antidyskinetic potential of  $\beta$ -blockers agents in PD.

**Keywords:** Parkinson's disease 1. L-DOPA 2. Dyskinesias 3. Noradrenergic system 4.  $\beta$ -adrenergic antagonists 5.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias neuronais afetadas na doença de Parkinson .....	27
<b>Figura 2.</b> Perfil de expressão dos genes que codificam os diferentes subtipos de receptores adrenérgicos no estriado de humanos.....	34
<b>Figura 3.</b> Desenho Experimental 1: Efeitos da desnervação noradrenérgica, dopaminérgica ou a combinação de ambas na expressão e desenvolvimento das LIDs .....	46
<b>Figura 4.</b> Desenho Experimental 2: Efeitos antidiscinéticos de antagonistas $\beta$ -adrenérgicos sob desnervação noradrenérgica e dopaminérgica .....	47
<b>Figura 5.</b> Degeneração induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB direito de ratos e o efeito do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina .....	50
<b>Figura 6.</b> Número de rotações contralaterais à lesão induzidas pela R(-)-apomorfina e sua correlação com o imunoconteúdo de TH .....	51
<b>Figura 7.</b> Os prejuízos motores causados pela administração de 6-OHDA no MFB direito são revertidos pela L-DOPA .....	53
<b>Figura 8.</b> As discinesias de pata, axial e orolingual e os movimentos involuntários anormais de locomoção durante as duas semanas de tratamento com a L-DOPA .....	54
<b>Figura 9.</b> Avaliação temporal dos escores de LIDs e movimentos involuntários anormais de locomoção após tratamento crônico com L-DOPA .....	55
<b>Figura 10.</b> Incidência de AIMs orofaciais, do membro anterior, axiais e de rotação contralateral à lesão .....	57
<b>Figura 11.</b> Correlação linear simples entre o imunoconteúdo de TH e os escores de discinesias ou movimentos involuntários de locomoção observados no décimo quarto dia de tratamento com a L-DOPA .....	58
<b>Figura 12.</b> Percentual de animais discinéticos durante as duas semanas de tratamento com a L-DOPA .....	59
<b>Figura 13.</b> Desafio com a L-DOPA após período de interrupção do tratamento .....	61
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol nas discinesias e movimentos anormais involuntários de locomoção induzidos pela L-DOPA .....	63
<b>Figura 15.</b> Avaliação temporal e topográfica dos escores de discinesias e movimentos anormais involuntários de locomoção induzidos pela L-DOPA após o tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol .....	65

<b>Figura 16.</b> Efeitos do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol sob a eficácia da L-DOPA em reduzir a assimetria no teste do cilindro .....	67
<b>Figura 17.</b> Efeitos do tratamento com L-DOPA e sua associação com amantadina, propranolol ou nadolol em animais lesionados com 6-OHDA no teste do campo aberto .....	68
<b>Figura 18.</b> Efeitos do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol sobre a eficácia da L-DOPA em reduzir os prejuízos motores induzidos pela lesão com 6-OHDA no teste do rota-rod .....	70
<b>Figura 19.</b> Grau de degeneração dopaminérgica induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB direito de ratos tratados com L-DOPA em associação à amantadina, propranolol, ou nadolol .....	71
<b>Figura 20.</b> Percentual de animais discinéticos no desafio com a L-DOPA e em dias subsequentes, que correspondem ao período de tratamento com amantadina, propranolol, ou nadolol associado à L-DOPA .....	73



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Drogas utilizadas no presente estudo .....	40
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina  
AIM - movimento anormal involuntário  
ANOVA - análise de variância  
COMT - catecol-O-metil-transferase  
DA - dopamina  
DARPP-32 - fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 KDa  
DAT - transportador de DA  
DBH - dopamina  $\beta$ -hidroxilase  
DDC - DOPA-descarboxilase  
DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
DP - doença de Parkinson  
EPM - EPM  
GPe - globo pálido externo  
GPi - globo pálido interno  
HVA - ácido homovanílico  
LID - discinesia induzida por L-DOPA  
LTD - depressão de longa duração  
LC - locus coeruleus  
i.p. - via intraperitoneal  
L-DOPA - levodopa  
LTP - potenciação de longa duração  
MAO-B - monoamino oxidase B  
MFB - do inglês, feixe prosencefálico medial  
MSNs - neurônios espinhais médios  
NA - noradrenalina  
NAT - transportador de noradrenalina  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
NST - núcleo subtalâmico  
RPM - rotações por minuto  
s.c. - via subcutânea  
SNC - sistema nervoso central  
SNpc - substância negra parte compacta  
SNpr - substância negra parte reticulada  
TH - tirosina hidroxilase  
v.o. - via oral  
VMAT - transportador de monoamina vesicular



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1	Doença de Parkinson .....	24
1.2	Neuropatologia da doença de Parkinson .....	25
1.3	Tratamento farmacológico da doença de Parkinson .....	28
1.4	Discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs) .....	29
1.5	Participação do sistema noradrenérgico no desenvolvimento das LIDs .....	31
1.6	Efeitos de antagonistas $\beta$ -adrenérgicos com potencial antidiscinético .....	33
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE DO TRABALHO .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1	Objetivo Geral .....	37
3.2	Objetivos Específicos .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Animais .....	39
4.2	Drogas .....	39
4.3	Cirurgia estereotáxica .....	41
4.4	Rotação com R(-)-apomorfina .....	41
4.5	Teste do cilindro .....	42
4.6	Campo aberto .....	42
4.7	Rota-rod .....	42
4.8	Discinesias induzidas por L-DOPA .....	43
4.9	Imunodeteção de proteínas ( <i>Western blot</i> ) .....	43
4.9.1	Preparação das amostras .....	44
4.9.2	Eletroforese e eletrotransferência .....	44
4.9.3	Imunodeteção da TH .....	44
4.10	Análise estatística .....	45
4.11	Desenhos experimentais .....	45
4.11.1	Desenho experimental 1 - LIDs <i>versus</i> lesões com 6-OHDA .....	45
4.11.2	Desenho Experimental 2 - LIDs <i>versus</i> antagonistas $\beta$ -adrenérgicos .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS (Capítulo I) .....</b>	<b>49</b>
5.1	Análise do grau de degeneração nigroestriatal induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB e influência do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina .....	49
5.2	Efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA sobre a assimetria motora de ratos hemiparkinsonianos .....	51
5.3	Efeitos do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA sobre as discinesias induzidas pela L-DOPA .....	53

5.4	Correlação entre o imunoconteúdo de TH e a severidade das LIDs e o percentual de animais que desenvolvem discinesias no decorrer do tratamento com a L-DOPA .....	57
<b>6</b>	<b>RESULTADOS (Capítulo II) .....</b>	<b>60</b>
6.1	Desafio farmacológico após seis dias de interrupção no tratamento com a L-DOPA em animais lesionados com a 6-OHDA .....	60
6.2	Efeito do tratamento agudo ou subcrônico com antagonistas $\beta$ -adrenérgicos nas discinesias induzidas pela L-DOPA .....	61
6.3	Efeitos do tratamento com antagonistas $\beta$ -adrenérgicos sobre os benefícios motores da L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos .....	66
6.4	Grau de degeneração da via nigroestriatal induzido por 6-OHDA e perfil do percentual de animais discinéticos no decorrer do tratamento com a L-DOPA em associação à amantadina, propranolol, nadolol ou veículo .	70
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A proporção de pessoas com idade superior a 60 anos está crescendo no mundo mais rapidamente do que qualquer outro grupo etário, como resultado de uma maior expectativa de vida e redução nas taxas de natalidade (*World Health Organization* - WHO, 2015). De acordo com projeções mundiais do Fundo de Populações das Nações Unidas (*United Nations Population Fund* - UNFPA), em 2050, 1 em cada 5 indivíduos terá 60 anos ou mais, onde, pela primeira vez, haverá mais idosos do que crianças e jovens menores de 15 anos (UNFPA, 2012). O envelhecimento da população brasileira segue esta mesma tendência do cenário mundial. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que o número de idosos mais que dobrou nos últimos 20 anos no Brasil, o censo divulgado em 2010 apontou que 7,4% da população brasileira está acima dos 60 anos de idade.

Embora o aumento na expectativa de vida possa ser visto como uma história de sucesso das políticas de saúde pública e do desenvolvimento socioeconômico e científico, este também representa um desafio à sociedade a fim de maximizar a capacidade da saúde destes indivíduos e minimizar o desenvolvimento dos chamados “males da idade”. Dentre as doenças neurodegenerativas associadas ao avanço da idade, destacam-se a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP) (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

A DP é uma doença que afeta 1-2% da população acima dos 60 anos de idade, sendo que essa proporção aumenta com o avanço da idade (DE LAU; BRETELER, 2006). Nos Estados Unidos da América (EUA), existem aproximadamente 500 mil portadores da DP, e são reportados mais de 50 mil casos novos todos os anos (LANDRIGAN et al., 2005). Segundo o IBGE (2000), existem aproximadamente 220 mil parkinsonianos no Brasil, totalizando 2% de brasileiros acima de 60 anos de idade acometidos pela DP.

Atualmente, a DP permanece como uma doença sem cura, com tratamentos paliativos que buscam atenuar principalmente os sintomas motores sem, todavia, retardar a progressão do processo neurodegenerativo. Além disso, os fármacos disponíveis atualmente são pouco eficazes em melhorar os sintomas não motores da DP, além de apresentarem diversos efeitos adversos com o uso prolongado, como no caso da levodopa (L-DOPA) (GAZEWOOD; RICHARDS; CLEBAK, 2013; OSSIG; REICHMANN, 2015). Para controle dos sintomas motores, a terapia de reposição dopaminérgica com a L-DOPA, que teve início na década de 1960, segue como o tratamento de primeira escolha

para maioria dos casos diagnosticados de DP. Porém, a utilização crônica da L-DOPA é associada, em grande parte dos casos, com flutuações motoras (fenômeno *on-off*) e oscilações de mobilidade decorrentes da deterioração de fim de dose (*wearing-off*), além do aparecimento de discinesias, principal comorbidade associada ao tratamento (caracterizada através de movimentos involuntários anormais) (FERNANDEZ, 2012; LEWITT, 2015).

Com base na problemática exposta, devido ao aumento na expectativa de vida e, conseqüentemente, a possibilidade de um maior número de indivíduos acometidos com a DP, o foco em amenizar os efeitos colaterais do principal e mais efetivo tratamento farmacológico para a DP tem um apelo justificável. O desafio em elucidar os mecanismos associados à complicação farmacoterapêutica de maior importância para pacientes parkinsonianos, as discinesias, poderá auxiliar na descoberta de novos alvos terapêuticos e, por conseguinte, melhorar a qualidade de vida dos pacientes com otimização do tratamento.

### **1.1 Doença de Parkinson**

A DP é uma doença de caráter neurodegenerativo e progressivo, sua etiologia primária permanece incerta, sendo considerada uma doença multifatorial envolvendo fatores ambientais (causas exógenas) e fatores genéticos (causa endógena) (CHIN-CHAN; NAVARRO-YEPES; QUINTANILLA-VEGA, 2015). Evidências sugerem que o estilo de vida e a exposição no período pré- e/ou pós-natal a determinados fatores ambientais predispõe o aparecimento de doenças neurodegenerativas em uma fase mais tardia da vida, tornando-se potenciais fatores de risco externos para o desenvolvimento da DP. Uma fração dos casos de pacientes diagnosticados com a DP apresenta ligação a hereditariedade familiar e admite-se claramente a relação com mutações em, pelo menos, seis genes associados a mecanismos moleculares subjacentes a patogênese da DP (COOKSON, 2012; CORTI; LESAGE; BRICE, 2011). Todavia, 90% dos casos de DP são esporádicos e não podem ser atribuídos a fatores genéticos, o que sugere que a DP tem uma etiologia complexa e determinada por diversos elementos (GOLDMAN, 2014).

A principal característica neuropatológica da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, mais especificamente, da região denominada substância negra parte compacta (SNpc), que projeta suas fibras dopaminérgicas para o estriado, localizado nos núcleos da base. Devido à neurodegeneração na SNpc, ocorre uma redução nos níveis de dopamina (DA) na região estriatal, levando a distúrbios motores



(DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além da redução de DA, observa-se uma redução dos seus metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), e na expressão das enzimas envolvidas na sua síntese, como a tirosina hidroxilase (TH) e a DOPA-descarboxilase (DDC). Além do prejuízo na via dopaminérgica nigroestriatal, outras estruturas cerebrais, como o locus coeruleus (LC), podem apresentar anormalidades histológicas e presença de inclusões citoplasmáticas nucleares, denominadas corpos de Lewy (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; PIFL; KISH; HORNYKIEWICZ, 2012).

Os sinais clínicos mais evidentes da DP são caracterizados por distúrbios motores irreversíveis e incapacitantes, os quais incluem rigidez muscular, instabilidade postural, tremor em repouso, fraqueza muscular e escassez de movimentos voluntários. Além disto, sintomas não motores são observados em pacientes que apresentam esta doença, como sinais autonômicos (aumento de salivação, seborreia, constipação, vermelhidão e sudorese), depressão, apatia, hiposmia, declínio cognitivo, demência e distúrbios do sono (SCHAPIRA et al., 2006).

## **1.2 Neuropatologia da doença de Parkinson**

Somado à degeneração da via nigroestriatal, a presença de corpos de Lewy é particularmente importante para o diagnóstico definitivo da DP. Este marcador neuropatológico consiste em inclusões citoplasmáticas nucleares formadas por agregados proteicos oxidados, nitrados e ubiquitinados, constituídos predominantemente pela proteína  $\alpha$ -sinucleína, além de ubiquitina, parkina e neurofilamentos (EVERSE; COATES, 2005; GUERRERO et al., 2013). Assim, há o indicativo que diversas outras anormalidades celulares estejam envolvidas na neuropatologia da DP, como a disfunção mitocondrial e lisossomal, o estresse oxidativo, a excitotoxicidade glutamatérgica, o estresse proteossômico, a neuroinflamação e a agregação de proteínas, modificações presentes tanto em pacientes com a DP esporádica, quanto em parkinsonianos com mutações genéticas e histórico de DP familiar (CHINTA et al., 2013; YACOUBIAN; STANDAERT, 2009)

Um modelo bem estabelecido para explicar os prejuízos motores presentes na DP, sustenta que a depleção de DA resulte em mudanças na plasticidade de neurônios estriatais. Estas alterações provocariam um desequilíbrio na atividade de vias neuroanatômicas que se projetam, através de outros núcleos, para estruturas de saída dos gânglios basais (CALABRESI et al., 2014; PREDIGER et al., 2014). O conjunto de núcleos basais está situado no mesencéfalo, formado pelo estriado

caudado e putâmen, globo pálido (segmento interno e externo – GPi e GPe, respectivamente), núcleo subtalâmico (NST), e substância negra (parte reticulada e parte compacta – SNpr e SNpc, respectivamente); juntamente com outras regiões do encéfalo, incluindo o córtex cerebral, tálamo, e diversos núcleos do tronco cerebral (BURCH; SHEERIN, 2005).

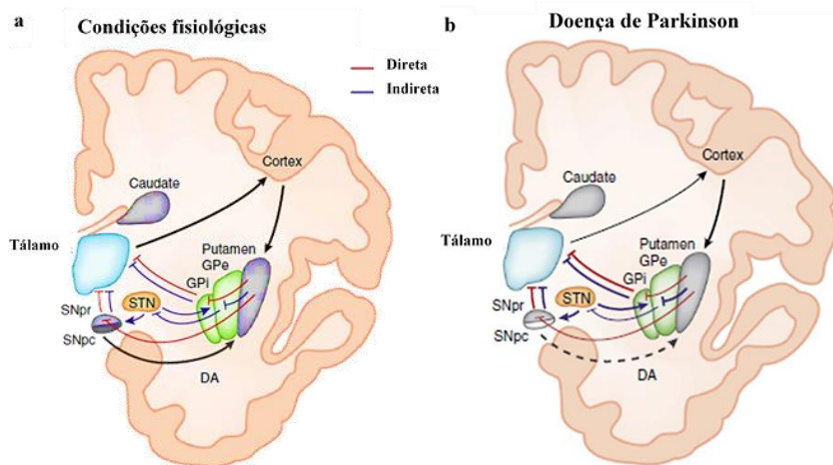
De acordo com este modelo, representado na Figura 1a, a ativação cortical produz uma liberação de glutamato que ativa neurônios espinhais médios (MSNs) estriatais projetando-se, especialmente, para o GPi e SNpr (representando a via direta). Esta população neuronal caracteriza-se por serem células GABAérgicas; assim, elas exercem uma ação inibitória sobre os neurônios do GPi e SNpr, que também são GABAérgicos. A inibição da SNpr leva a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, que recebem aferências da SNpr e se projetam para o córtex. O resultado comportamental desta cadeia de eventos é de ativação locomotora, permitindo a execução dos movimentos. Por outro lado, a ativação de MSNs estriato-palidais, que se projetam para a SNpr indiretamente através do GPe e NST (via indireta), inibe os neurônios gabaérgicos do GPe, que conduz a uma desinibição de neurônios glutamatérgicos do NST. O aumento da liberação de glutamato desses neurônios excitatórios NST por sua vez, ativa os neurônios GABAérgicos da SNpr que se projetam para o tálamo, resultando na redução da atividade locomotora e movimento (CALABRESI et al., 2014; PREDIGER et al., 2014; SCHWARTZ; SABETAY, 2012).

Além disso, pode-se ter a condução de fortes efeitos excitatórios a partir de áreas motoras corticais sem que haja a passagem pelo estriado (via hiperdireta). Através desta via, temos uma excitação breve que envolve uma ativação do NST diretamente pelo córtex, e a posterior inibição do tálamo a partir de projeções do GPi sob estímulo do NST. Assim, temos a inibição de grandes áreas do tálamo e do córtex cerebral que estão relacionadas tanto com o programa motor selecionado quanto com outros programas competitivos. Então, através da subsequente ação das vias direta e indireta, somente o movimento desejado é iniciado, executado e terminado no tempo determinado, enquanto os outros comportamentos motores competitivos são cancelados. As interações entre essas vias não foram completamente elucidadas, mas é sabido que o bom funcionamento dos núcleos da base resulta de um delicado equilíbrio entre elas (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002).

Em adição, os MSNs da via direta e indireta são caracterizados pela expressão diferencial de receptores para DA. Receptores D1 para DA são expressos por MSNs da via direta, enquanto que os receptores D2 para

DA são expressos por MSNs da via indireta. Além disso, os MSNs estriatais que se projetam para a SNpr expressam substância P e dinorfina, além de receptores D1, enquanto MSNs estriatais que fazem aferência ao GPe expressam encefalina e receptores D2. Outras diferenças neuroquímicas foram encontradas nesses subtipos neuronais, uma vez que estes dois receptores estão acoplados com proteínas G distintas (D1 – Gs; D2 – Gi) que se ligam a vias distintas de sinalização intracelular e levam a diferentes respostas bioquímicas seguintes à ativação de receptores para DA. Esta segregação neuroquímica é considerada um apoio adicional para o efeito bifurcado da ativação das vias diretas e indiretas (PREDIGER et al., 2014; SCHWARTZ; SABETAY, 2012).

Na DP, como ilustrado na Figura 1b, a depleção nos níveis de DA faz com que ocorra uma menor ativação dos receptores D2 da via indireta, levando a uma inibição excessiva do GPe e desinibição do NST, além de hipoativação da via direta mediada por receptores D1 para DA. Como resultado final temos a ativação excessiva do GPi e SNpr, inibição do tálamo e de sistemas do tronco cerebral motor levando ao surgimento dos sintomas motores característicos na DP (HIRSCH et al., 2000; OBESO et al., 2006).



**Figura 1:** Vias neuronais afetadas na doença de Parkinson. (a) representação das vias em condições normais. (b) representação das vias alteradas na doença de Parkinson. Legenda: GPi: Globo pálido interno; GPe: Globo pálido externo; SNpc: Substância negra parte compacta; SNpr: Substância negra parte reticulada, NST: núcleo subtalâmico (modificado de (CALABRESI et al., 2014).

### 1.3 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson

As opções farmacoterapêuticas para pacientes parkinsonianos aumentaram consideravelmente nos últimos 25 anos, assim como o entendimento da patogênese da DP. Até a década de 1960, o tratamento medicamentoso foi limitado a anticolinérgicos (biperideno, metixeno e triexifenidil), que apresentam baixa eficácia e uma alta incidência de efeitos colaterais gastrointestinais e neuropsiquiátricos (KATZENSCHLAGER et al., 2003). A introdução da L-DOPA teve um impacto dramático, reduzindo significativamente os escores de incapacidade e a mortalidade, levando a um aumento na qualidade de vida dos usuários com DP (MAIER HOEHN, 1983). Outras estratégias terapêuticas são utilizadas com o objetivo de aumentar o tônus dopaminérgico, como agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, lissurida, pergolida e pramipexol), inibidores seletivos da recaptação de dopamina e inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoamino oxidase B (MAO-B) (entacapona e seleginina, respetivamente), além da amantadina (antagonista glutamatérgico de receptores NMDA) (GIROUX, 2007).

Apesar do surgimento de novos fármacos dopaminérgicos para a DP, a L-DOPA permanece como tratamento padrão ouro, mesmo após 50 anos da sua introdução no mercado e incansáveis pesquisas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Todavia, mesmo com a eficácia demonstrada pelo tratamento com a L-DOPA, a sua associação com o surgimento de complicações motoras pode ser causa na redução da prescrição desta medicação (MARSDEN; PARKES, 1977). Em um ensaio clínico padronizado, demonstrou-se que doses elevadas de L-DOPA associadas a carbidopa (inibidor da DDC periférica) são um fator agravante no desenvolvimento de complicações motoras (FAHN; PARKINSON STUDY, 2005). Estas complicações podem surgir de 5 a 6 meses após o início do tratamento com doses  $\geq 600$  mg/dia (FAHN; PARKINSON STUDY, 2005). Devido ao efeito liga-desliga e as discinesias associadas à terapia convencional com a L-DOPA, a longo prazo, estes efeitos colaterais podem resultar em invalidez e ter um impacto negativo na qualidade de vida do paciente parkinsoniano (CHAPUIS et al., 2005). Assim, estratégias que visem a otimização dos atuais fármacos disponíveis, em especial a L-DOPA, parecem ser alternativas viáveis e com grande impacto na melhoria da qualidade de vida de uma expressiva parcela de pacientes com a DP.

## 1.4 Discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs)

As discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs) (do inglês *L-DOPA-induced dyskinesias*) representam a principal complicação da farmacoterapia da DP. Apesar de ser o fármaco mais eficaz para tratar os sinais e sintomas da patologia, estas complicações motoras podem limitar a sua utilização. Cerca de 30% e 90% dos pacientes com DP, após 5 e 9 anos de tratamento com L-DOPA, respectivamente, desenvolvem os movimentos anormais involuntários clássicos das LIDs (AHLSSKOG; MUENTER, 2001).

Embora uma variedade ampla de medicamentos possa levar ao aparecimento de discinesias, os mecanismos decorrentes das LIDs em pacientes parkinsonianos apresentam bases neuropatológicas distintas dos distúrbios do movimento induzidos por determinados neurolépticos e antieméticos, associados às discinesias tardias (HORN, 2004). As LIDs têm sido atribuídas a um desequilíbrio entre as vias de promoção e supressão do movimento nos gânglios basais, favorecendo a via direta através da ativação de receptores D1 para DA e reduzindo a ativação da via indireta através de receptores D2. Esta noção é corroborada pelas alterações opostas na atividade metabólica e as taxas médias de descarga neuronal nos núcleos dos gânglios basais sob uma desnervação dopaminérgica e reposição de DA com L-DOPA (BEZARD; BROTHIE; GROSS, 2001; CENCI, 2007; VITEK; GIROUX, 2000).

As discinesias não podem, contudo, serem vistas como um mero exagero do movimento dentre os processos de seleção fisiológica, pois elas diferem do movimento normal nas suas qualidades físicas básicas (GOUR et al., 2007). O padrão mais comum de discinesias consiste em movimentos predominantemente coreiformes, podendo ocorrer uma mistura de coreia, com ativação muscular em uma sequência irregular; balismo, sendo predominante de músculos proximais dos membros; distonia, com contrações previsíveis; e, raramente, mioclonia, caracterizada por movimentos abruptos e rápidos; que, comumente, aparecem no momento em que a L-DOPA atinge os seus níveis máximos plasmáticos e no encéfalo (“discinesia de pico de dose”) (GOUR et al., 2007; HORN, 2004).

Além disso, estudos de imagem funcional em pacientes com DP discinéticos revelaram padrões bastante anormais de ativação cortical durante a execução de tarefas motoras simples (RASCOL et al., 1998). Movimentos discinéticos são, portanto, susceptíveis de resultar de distúrbios neuroquímicos e fisiológicos substanciais nas conexões

ganglionares tálamo-corticais e córtico-basais motoras, cuja natureza ainda é incerta (CENCI; LINDGREN, 2007).

Estudos clínicos identificaram que o desenvolvimento das discinesias está associado a três fatores de risco principais: idade jovem no início da doença, gravidade da doença (que reflete o grau de degeneração dopaminérgica) e altas doses de L-DOPA (SCHRAG; QUINN, 2000). Estes fatores de risco são reproduzidos em modelos animais usando primatas não humanos e roedores pela indução de lesões neurotóxicas na via nigrostriatal dopaminérgica, seguida pela administração diária de L-DOPA em uma dosagem suficiente para gerar um quadro discinético (6 - 25 mg/kg, uma ou duas vezes ao dia) (DEKUNDY et al., 2007; LINDGREN et al., 2007; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2005). Durante o período de tratamento, os animais desenvolvem movimentos involuntários anormais, que são funcionalmente equivalentes às “discinesias de pico de dose” observada em pacientes parkinsonianos tratados com L-DOPA (CENCI, M. ANGELA; LUNDBLAD, MARTIN, 2006).

As estratégias de tratamento para redução das discinesias incluem redução da dose do precursor dopaminérgico e aumento de tempo no intervalo posológico de administração. Além disso, estudos têm indicado que iniciar o tratamento da DP precoce com agonistas dopaminérgicos (pramipexol), postergando o início de uso da L-DOPA, retarda o desenvolvimento de discinesias e flutuações motoras. Outra alternativa é a administração da amantadina, um fármaco amplamente utilizado na prática clínica diária, que apresenta eficácia na redução da “discinesia de pico de dose”. Para terapêutica da LID grave, a única opção terapêutica, atualmente, é através da intervenção neurocirúrgica ablativa ou estimulação cerebral profunda nos núcleos da base, que representam alternativas caras, invasivas e não podem ser oferecidas a todos os pacientes com a DP (THANVI; LO; ROBINSON, 2007).

Neste sentido, diversos estudos têm surgido demonstrando potencial terapêutico farmacológico para controle da LID, inclusive com ação sob outros sistemas que não o dopaminérgico. Assim como a amantadina, outros compostos glutamatérgicos possuem estudo em fase clínica com eficácia antidiscinética, além de estratégias emergentes com ação sob o sistema serotoninérgico, adenosinérgico, sob a neurotransmissão colinérgica e noraadrenérgica. O direcionamento farmacológico de compostos relacionados com estes sistemas pode reduzir, prevenir ou atrasar o desenvolvimento das LIDs, sendo demonstrados a partir de ensaios clínicos randomizados e diversos estudos pré-clínicos que associam o aparecimento e surgimento das LIDs

à mecanismos adicionais aos dopaminérgicos (BARGIOTAS; KONITSIOTIS, 2013; SCHAEFFER; PILOTTO; BERG, 2014).

### **1.5 Participação do sistema noradrenérgico no desenvolvimento das LIDs**

A noradrenalina (NA) e a DA possuem relações moleculares, funcionais e anatômicas íntimas, o que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos pelos quais a NA poderia modular o sistema dopaminérgico e desempenhar um papel relevante na progressão da DP, assim como nas LIDs. Em primeira instância, a NA e a DA são neurotransmissores que partilham uma mesma via biossintética, a DA é, de fato, o precursor direto da NA (MOLINOFF; AXELROD, 1971). Em neurônios dopaminérgicos, o aminoácido tirosina é convertido em L-DOPA pela enzima TH, que é subsequentemente convertida para DA pela enzima DDC, a DA recém-sintetizada pode ser transportada para vesículas sinápticas pelo transportador de monoamina vesicular (VMAT) ou liberada nos terminais pré-sinápticos. Em neurônios noradrenérgicos, a enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilase (DBH) atua no interior das vesículas sinápticas convertendo DA em NA.

Em adição, os neurônios noradrenérgicos inervam diretamente neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo e estriado. A estimulação do LC facilita a excitabilidade de neurônios da SNpc, enquanto que a utilização de determinados antagonistas de receptores noradrenérgicos atenuam a taxa de disparo e excitabilidade neuronal da SNpc (GRENHOFF; SVENSSON, 1993). DBH, NA, e o transportador de NA (NAT) podem ser detectados no mesencéfalo e corpo estriado (GLOWINSKI; IVERSEN, 1966; LIPRANDO et al., 2004; ROSS; REIS, 1974; UDENFRIEND; CREVELING, 1959) e, em outras regiões encefálicas, a liberação de NA estriatal é controlada por ambos, NAT e autoreceptores noradrenérgicos (GOBERT et al., 2004; YAVICH et al., 1997; YAVICH et al., 2003). Finalmente, as lesões de desnervação e depleção de NA no LC, de forma crônica, reduzem a liberação de DA no estriado (LATEGAN; MARIEN; COLPAERT, 1990; 1992) e resultam na regulação compensatória positiva de receptores dopaminérgicos pré-sinápticos no estriado (HARRO et al., 2003; SCHANK et al., 2006). Combinados, estes resultados estabelecem uma ligação funcional entre os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, que pode formar a base para a influência da NA na neuropatologia da DP e nas LIDs.

Especialmente na última década, tem sido reportado que na DP, a perda noradrenérgica no LC seja maior do que a perda dopaminérgica na

SNpc (ZAROW et al., 2003), sendo acompanhada pela presença dos corpos de Lewy; e ainda, que essas alterações possam ocorrer anteriormente a lesão dopaminérgica (BRAAK; DEL TREDICI, 2008). Da mesma forma, evidências sugerem que os níveis de NA possam modular as LIDs, ainda que os mecanismos responsáveis por estes efeitos não tenham sido elucidados (OSTOCK et al., 2014). O sistema noradrenérgico inerva os gânglios da base e, recentemente, tem sido implicado nas discinesias por várias linhas de investigação, modulações pré-sinápticas com conversão da DA em excesso, ou alterações pós-sinápticas, uma vez que poderia agir em uma gama de processos intracelulares com alteração na sinalização celular e consequente plasticidade sináptica, como resultado final da ativação de receptores adrenérgicos (DELAVILLE; DEURWAERDERE; BENAZZOUZ, 2011).

Trabalhos recentes indicam que a gravidade das discinesias é positivamente correlacionada com os parâmetros basais de disparo de neurônios do LC (MIGUELEZ et al., 2011) e que a infusão direta de NA exógena no estriado induz discinesias em ratos hemiparkinsonianos (BUCK; FERGER, 2009). Há também evidências de que o NAT poderia transportar a DA proveniente do tratamento com L-DOPA após a perda de terminações dopaminérgicas no estriado observada na DP, podendo desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento das LIDs (ARAI et al., 2008). Finalmente, estudos independentes em modelos experimentais e pacientes parkinsonianos têm sugerido que compostos que possuem como alvo o sistema noradrenérgico podem apresentar efeitos antidiscinéticos (BARNUM et al., 2012; LINDENBACH et al., 2011; RASCOL et al., 2001).

Grande parte dos modelos animais usados para o estudo das LIDs são de lesões dopaminérgicas seletivas para a via nigroestriatal, não exibindo a perda de neurônios noradrenérgicos observada na condição humana. Na verdade, frequentemente, o inibidor da recaptação de NA desipramina é administrado antes da infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (neurotoxina utilizada em modelos da DP) para evitar a neurodegeneração noradrenérgica em modelos animais da DP. Os escassos estudos que avaliam diretamente se o sistema noradrenérgico tem influência nas discinesias obtiveram respostas comportamentais contraditórias, existindo relatos de que a degeneração noradrenérgica aumentou (FULCERI et al., 2007; MIGUELEZ et al., 2011), reduziu (BARNUM et al., 2012), ou não alterou (MIGUELEZ et al., 2011; PEREZ; MARIN; et al., 2009) a gravidade ou duração das discinesias em modelos experimentais da DP.



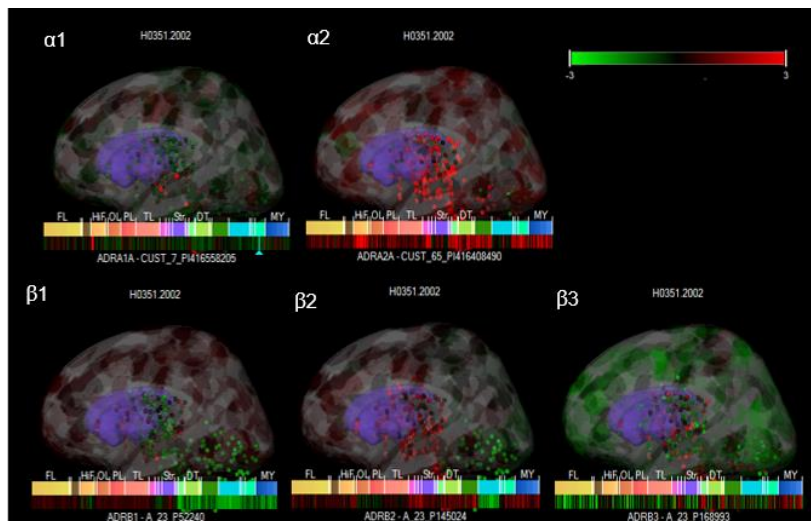
## 1.6 Efeitos de antagonistas $\beta$ -adrenérgicos com potencial antidiscinético

O sistema noradrenérgico pode ser dividido em dois grupos neuronais distintos localizados no tronco cerebral: um composto por grupos neuronais difusos localizados no bulbo, e outro, corresponde ao LC localizado na ponte. O núcleo LC está presente em todos os mamíferos e representa a principal fonte de NA para o sistema nervoso central (SNC) (ASTON-JONES; COHEN, 2005). O LC, através de suas projeções, modula o circuito cortical, subcortical, e do tronco cerebral; por outro lado, diversos sistemas aferem para o LC influenciando na atividade dos seus neurônios. Através da liberação de NA em várias áreas do cérebro, incluindo neocórtex, hipocampo, tálamo, núcleo subtalâmico, e substância negra, o LC modula uma variedade de funções centrais. Essas projeções apresentam-se esparsas na medula espinhal e no estriado (BENARROCH, 2009).

A NA exerce seus efeitos através da ativação de adrenoceptores, que são receptores acoplados à proteína G, sendo divididos em receptores  $\alpha$  e  $\beta$  e subdivididos em nove subtipos que se associam a diferentes proteínas G e levam a ativação de cascatas intracelulares distintas. Assim, os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos abrangem  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ , enquanto os  $\beta$ -adrenoceptores englobam os subtipos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (KOBILKA, 2011). Esses receptores são encontrados em todo o encéfalo, incluindo o estriado (como pode ser observado na Figura 2) e a SNpc, e apresentam tanto um caráter inibitório ( $\alpha_2$ , pré-sináptico) (BENARROCH, 2009), quanto excitatório ( $\alpha_1$  e  $\beta$ -adrenoceptores, pós-sinápticos), dependendo da subfamília em questão (ARCOS et al., 2003; MCCORMICK; PAPE; WILLIAMSON, 1991).

Um papel importante dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no desenvolvimento das discinesias é suportado por evidências neuroanatômicas e estudos farmacológicos. Os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos são amplamente expressos no corpo estriado e parecem estar intactos em pacientes com a DP, tornando-os alvos terapêuticos viáveis contra as discinesias (LINDENBACH et al., 2011). Dentre os estudos com antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, em especial, destaca-se a utilização do propranolol (antagonista não-seletivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos), como uma alternativa de antidiscinético com potencial terapêutico promissor (BARNUM et al., 2012; BHADE et al., 2015; BUCK; FERGER, 2010; CARPENTIER et al., 1996; DEKUNDY et al., 2007; GOMEZ-MANCILLA; BEDARD, 1993; GOSHIMA; MISU; et al., 1991; GOSHIMA; NAKAMURA; et al., 1991; LINDENBACH et al.,

2011). A citar, os trabalhos de Hara e colaboradores e Meitzen e colaboradores (2010 e 2011, respectivamente) relataram que os efeitos antidiscinéticos do propranolol podem estar associados a mecanismos de modulação pós-sináptica de neurônios emergentes do estriado (HARA et al., 2010; MEITZEN et al., 2011).



**Figura 2: Perfil de expressão dos genes que codificam os diferentes subtipos de receptores adrenérgicos no estriado de humanos.** A região demonstrada em roxo corresponde ao estriado, uma escala de intensidade indica a menor (verde) ou maior (vermelho) expressão gênica (extraído de ALLEN HUMAN BRAIN ATLAS).

## **2 HIPÓTESE DO TRABALHO**

A hipótese do presente trabalho é de que a degeneração noradrenérgica, que comumente antecede à degeneração dopaminérgica da via nigro-estriatal na DP, possa ser elemento chave no surgimento e desenvolvimento das LIDs. Postula-se, que antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos possuam um efeito antidiscinético mesmo após a instauração e consolidação desse processo de plasticidade mal adaptada. E que o recrutamento de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de regiões centrais e periféricas tenham efeitos distintos neste processo, sendo as propriedades responsáveis pela redução das LIDs decorrentes de mecanismos centrais.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação do sistema noradrenérgico no desenvolvimento das LIDs em um modelo animal da DP, e investigar o potencial de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos como agentes antidiscinéticos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar modelos de lesão dopaminérgica, noradrenérgica ou a associação de ambas, a partir da administração prévia de desipramina, nomifensina ou veículo em uma lesão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (MFB, do inglês *medial forebrain bundle*).

- Investigar os efeitos de lesões unilaterais com 6-OHDA no MFB em associação à administração prévia de desipramina, nomifensina ou veículo, sob a assimetria motora no desafio farmacológico com a R(-)-apomorfina, e através do comportamento exibido no teste do cilindro.

- Investigar o efeito do tratamento prévio com desipramina, nomifensina ou veículo em ratos hemiparkinsonianos lesionados com a 6-OHDA no surgimento e desenvolvimento das discinesias induzidas pelo tratamento crônico com a L-DOPA.

- Investigar os efeitos do tratamento agudo e subcrônico com propranolol, nadolol e amantadina sobre as discinesias e AIMs de locomoção.

- Avaliar a influência do tratamento com propranolol, nadolol e amantadina sobre a eficácia da L-DOPA em ratos com lesão unilateral de 6-OHDA no MFB, nos testes comportamentais para controle motor: teste do cilindro, campo aberto e rota-rod.

- Avaliar a influência do tratamento com propranolol, nadolol e amantadina sobre a eficácia da L-DOPA em ratos com lesão unilateral de 6-OHDA no MFB e comprovar grau de neurodegeneração dopaminérgica



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (3-4 meses, 270-350 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas (49 x 34 x 16 cm) em número máximo de cinco animais por gaiola. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada em  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00-19:00 h) livre acesso à água e ração. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo nº 104/CEUA/PRPE/2012.

### 4.2 Drogas

O presente trabalho utilizou a manipulação farmacológica com três diferentes objetivos: (i) modelagem experimental do Parkinsonismo, (ii) desafio comportamental à supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos frente à neurodegeneração dopaminérgica; e, (iii) estudo de drogas com potencial antidiscinético.

As doses das drogas foram previamente estabelecidas a partir de estudos pilotos do grupo e baseadas em trabalhos prévios da literatura (BARNUM et al., 2012; CAILLE et al., 1999; DELAVILLE; NAVAILLES; BENAZZOUZ, 2012). As drogas foram administradas por suas respectivas vias e doses (ver Tabela 1) no volume de 1 ml/kg de massa corporal (exceção para a neurotoxina 6-OHDA), sendo utilizado solução salina (NaCl 0,9%) como veículo (exceção para combinação de L-DOPA/benserazida). Devido à natureza oxidante da 6-OHDA e da R(-)-apomorfina, o metabisulfito de sódio 0,1% ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) foi usado como veículo, além da solução salina. Devido à alta lipossolubilidade do antagonista  $\beta$ -adrenérgico, propranolol, este foi pré-solubilizado com 1% de Tween 80 e 5% de DMSO (dimetilsulfóxido) em associação a solução veículo com salina. A solução de L-DOPA e benserazida foi obtida a partir da solubilização em água de comprimidos dispersíveis (Prolopa®, Hoffman-LaRoche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), estes foram diluídos 8 vezes à sua concentração inicial de 100/25 mg, respetivamente.

**Tabela 1. Drogas utilizadas no presente estudo.**

<b>Droga</b>	<b>Concentração/ Dose/Via</b>	<b>Ação/Característica</b>
<b>Cloridrato de 6-hidroxidopamina (6-OHDA)</b>	8 µg/µl, MFB	Neurotoxina para neurônios catecolaminérgicos
<b>Cloridrato de desipramina</b>	25 mg/kg, i.p.	Inibidor do transportador de NA
<b>Maleato de nomifensina</b>	10 mg/kg, i.p.	Inibidor da recaptação de DA
<b>Cloridrato de R(-)-apomorfina</b>	0,5 mg/kg, s.c.	Agonista não-seletivo dos receptores para DA
<b>Levodopa (L-DOPA)</b>	12,5 mg/kg, v.o.	Precursor da DA
<b>Cloridrato de benserazida</b>	3,125 mg/kg, v.o.	Inibidor periférico da enzima DDC
<b>Cloridrato de amantadina</b>	40 mg/kg, i.p.	Antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA
<b>Cloridrato de (±)-propranolol</b>	20 mg/kg, i.p.	Antagonista β-adrenérgico não-seletivo
<b>Cloridrato de nadolol</b>	20 mg/kg, i.p.	Antagonista β-adrenérgico não-seletivo [não atravessa a barreira hematoencefálica (CRUICKSHAN; PRICHARD, 1987)]

Legenda: via intraperitoneal (i.p.); subcutânea (s.c.); oral (v.o.).



### 4.3 Cirurgia estereotáxica

Para a lesão da via nigroestriatal utilizou-se a neurotoxina 6-OHDA, baseada em estudos prévios do grupo (AGUIAR et al., 2013; MATHEUS et al., 2015) e de trabalhos da literatura (PADOVAN-NETO et al., 2009), com o objetivo de causar uma lesão em neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, semelhante à observada em pacientes com a DP. Além disso, no desenho experimental 1 (descrito na pág. 45), um grupo de animais recebeu cloridrato de desipramina (25 mg/kg, i.p., 30 min antes da 6-OHDA), enquanto outro recebeu cloridrato de nomifensina (10 mg/kg, i.p., 60 min antes da 6-OHDA) com o intuito de causar lesões seletivas de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, respectivamente. Resumidamente, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) via i.p., e posicionados no aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo USA). Após, receberam uma microinjeção única de 3 µl de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; concentração de 8 µg/µl em solução salina 0,9% contendo 0,1% de metabissulfito de sódio) no feixe prosencefálico medial (MFB) direito. As coordenadas utilizadas relativas ao Bregma (em mm) foram: antero-posterior (AP): -4,4; lateral (L): -1,2 e dorso-ventral (DV): -8,2 (PAXINOS; WATSON, 1998). A velocidade da microinjeção de 6-OHDA foi de 1 µl/min e, após o término da microinjeção, a cânula foi mantida imóvel por um tempo adicional de 3 min para evitar refluxo da droga. Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos até recuperação da anestesia.

### 4.4 Rotação com R(-)-apomorfina

A utilização do teste de comportamento rotatório em conjunto com a detecção de neurônios dopaminérgicos na substância negra e de seus terminais no estriado com a quantificação da enzima TH, constituem as principais ferramentas de monitoramento do grau da lesão produzida pela 6-OHDA (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998). A análise do comportamento rotatório foi realizada em cilindros (24 cm de diâmetro x 30 cm de altura) e consistiu em observar e quantificar o número de giros em 360° no sentido contralateral à lesão durante 30 min após a administração de hidrocloreto de R(-)-apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.). Com o objetivo de minimizar possíveis vieses de avaliação, antes do início do teste, os animais foram colocados nos aparatos durante 5 min para habituação. O número de rotações no sentido horário e anti-horário foi avaliado com o auxílio do programa analisador de imagens ANY-maze™.

#### **4.5 Teste do cilindro**

O teste do cilindro é utilizado para avaliar assimetria de apoio das patas dianteiras após lesões unilaterais em núcleos responsáveis por funções motoras no SNC (MABANDLA; RUSSELL, 2010; TAJIRI et al., 2010). Os animais foram colocados dentro de um cilindro transparente (24 cm de diâmetro x 30 cm de altura) para registro dos contatos das patas dianteiras à parede do cilindro durante 5 min. Foram computados os atos de encostar das patas ipsilateral e contralateral à lesão, assim como de ambas as patas simultaneamente na parede do cilindro.

#### **4.6 Campo aberto**

Utilizou-se o campo aberto para determinar a atividade locomotora horizontal espontânea dos animais (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). Este teste foi realizado durante 5 min de livre exploração em uma arena (1 m x 1 m), e parâmetros de distância percorrida (m), velocidade média (m/min), velocidade máxima (m/min), e o número de rotações no sentido horário e anti-horário foram avaliados com o auxílio do ANY-maze<sup>TM</sup>.

#### **4.7 Rota-rod**

A avaliação da função motora dos animais, como coordenação e equilíbrio, foi verificada através do teste do rota-rod (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil), no qual foi avaliado o tempo que o animal permaneceu em equilíbrio em uma barra cilíndrica em movimento (AGUIAR et al., 2009; CORDOVA et al., 2012; JIANG et al., 2004). Primeiramente, os animais foram treinados na barra estacionária [zero rotações por minuto (RPM)] durante 30 s, seguido pelo cilindro a 5 RPM constante durante 90 s. Aqueles com número de quedas superior a cinco foram descartados das sessões de teste, a fim de que todos os grupos apresentassem a mesma medida motora basal. Após 30 min, os animais selecionados foram testados na versão acelerada do rota-rod, velocidade inicial de 5 RPM e aceleração 0,1 revolução/s (JIANG et al., 2004). Na sessão de teste, o animal foi colocado no rota-rod e a sua latência para queda e aceleração foram determinadas, sendo considerado o tempo máximo de teste de 300 s. A aceleração na sessão de teste ocorreu após 60 s com rotação fixa em 5 RPM.

## 4.8 Discinesias induzidas por L-DOPA

O monitoramento das LIDs baseou-se no sistema de escores de AIMs (AGUIAR et al., 2013; CENCI; LEE; BJORKLUND, 1998). Os animais foram colocados individualmente em cilindros transparentes (24 cm de diâmetro x 30 cm de altura) e cada um dos movimentos involuntários foram analisados durante 1 min, com um intervalo de 10 min entre as avaliações. O tempo total de observação foi de 2 h após a administração (v.o.) de L-DOPA (12,5 mg/kg), combinada com a benserazida (3,125 mg/kg). A classificação dos movimentos involuntários anormais foi dividida em quatro parâmetros diferentes, de acordo com sua topografia:

- i) discinesia axial, posturas torcidas do tronco superior e pescoço, orientados de maneira contralateral ao lado da cirurgia;
- ii) discinesia de membro anterior, distonia ou movimentos hipercinéticos da pata anterior contralateral à lesão, seja no plano sagital ou frontal;
- iii) discinesia orolingual, espasmos da musculatura orofacial e protrusão da língua orientada contra lateralmente ao lado da cirurgia;
- iv) locomoção, rotação contralateral à lesão.

Para cada um dos parâmetros foi computado o escore correspondente (0-4, sendo 0: ausência; 1: presença < 30 s; 2: presença > 30 s; 3: durante 1 min, interrompida por distração sensorial e 4: ininterrupto). Ao final, totalizou-se avaliações em 12 diferentes tempos, com atribuição de escores para cada uma dos quatro parâmetros de movimentos involuntários.

A amantadina (40 mg/kg, i.p.) foi usada como controle positivo (antidiscinético usado na clínica) e administrada 40 min antes da avaliação das discinesias. Os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos propranolol e nadolol (ambos, 20 mg/kg, i.p.) foram avaliados como agentes com potencial antidiscinético e administrados 10 min antes da avaliação das discinesias.

## 4.9 Imunodeteção de proteínas (*Western blot*)

Para avaliar o imunoconteúdo da enzima TH, a técnica de Western blot foi realizada como descrito previamente (CORDOVA et al., 2004; LEAL et al., 2002; LOPES et al., 2015).

### **4.9.1 Preparação das amostras**

Os animais foram eutanasiados 3 h após a última administração de L-DOPA, em ambos os Desenhos Experimentais. O corpo estriado (direito e esquerdo) dos animais foi dissecado (4°C) em solução de coleta (sacarose 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 mM, glicose 5 mM, HEPES 25 mM pH 7,4), colocado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito previamente (OLIVEIRA et al., 2008). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 300 µL do tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para eliminar os restos celulares, e os sobrenadantes diluídos 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8% e aquecidos a 100°C por 5 min. A dosagem de proteínas foi determinada com o método descrito por Peterson (PETERSON, 1977). A seguir, foram adicionados nas amostras o tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%).

### **4.9.2 Eletroforese e Eletrotransferência**

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio/SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S.

### **4.9.3 Imunodetecção da TH**

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1 h e após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) incubadas “overnight” (4°C) com os anticorpos específicos para as formas totais de TH e β-actina. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo BSA 2% nas diluições: 1:10.000 (anti-total-TH) e 1:2.500 (anti-

$\beta$ -actina). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-mouse (ligado à peroxidase) e reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados à membrana de nitrocelulose, de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- $\beta$ -actina para verificar se as mesmas quantidades de proteínas foram aplicadas no gel. O imunconteúdo de TH foi determinado pela razão entre a densidade óptica da banda de TH e a densidade óptica da banda da  $\beta$ -actina (CALLONI et al., 2005; POSSER et al., 2007). As bandas foram quantificadas utilizando o software Image J®. O anticorpo anti-TH total, detecta uma única banda de aproximadamente 60 kDa, enquanto o anticorpo anti- $\beta$ -actina detecta uma única banda de aproximadamente 45 kDa. A Figura 4 ilustra resumidamente todo o procedimento metodológico.

#### **4.10 Análise estatística**

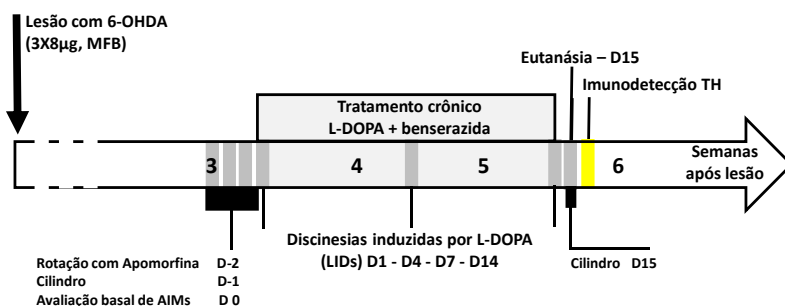
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (EPM). Após assegurar a distribuição normal das amostras, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Para situações em que reexposição ao mesmo contexto foram realizadas, adotou-se a ANOVA com medidas repetidas. Quando adequado, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls para determinar as diferenças entre os grupos. O teste “t” de Student foi adotado para a comparação de dois grupos independentes, ou grupos pareados, quando necessário. Para o cálculo da correlação foi realizada uma regressão linear simples entre as variáveis (dependentes e independentes). Em todos os testes, foi considerado um  $P < 0,05$  como indicativo de diferenças significativas. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistic® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados com o GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

#### **4.11 Desenhos experimentais**

##### **4.11.1 Desenho experimental 1 - LIDs versus lesões com 6-OHDA**

O objetivo do primeiro desenho experimental foi determinar se uma lesão no sistema noradrenérgico modificaria o desenvolvimento das discinesias durante o período de tratamento com a L-DOPA. Para isso

utilizamos os seguintes grupos experimentais: veículo+veículo/L-DOPA (n=8, grupo sham); veículo+6-OHDA/L-DOPA (n=8); desipramina+6-OHDA/L-DOPA (n=8); nomifensina+6-OHDA/L-DOPA (n=8). A dose de L-DOPA utilizada foi de 12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida, administrada pela v.o. uma vez ao dia durante 15 dias. As discinesias orofaciais, de membro e axial, assim como as pontuações com escores de rotações foram avaliadas nos dias 0, 1, 4, 7 e 14 de tratamento com a L-DOPA (a cada 10 min por 2 h). O teste do cilindro foi realizado antes de iniciar o tratamento com a L-DOPA e 1 h após a última administração de L-DOPA (15º dia).

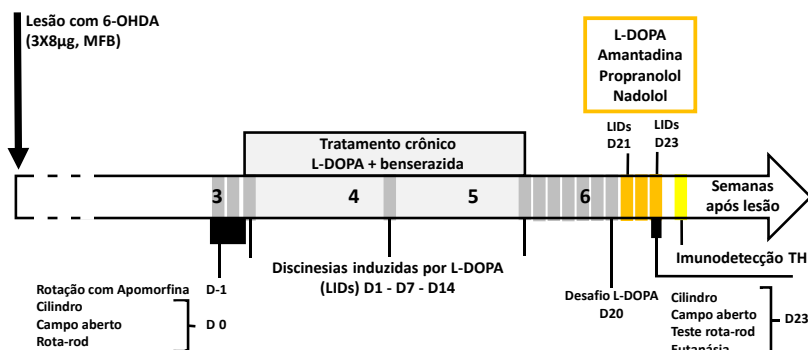


**Figura 3. Desenho Experimental 1:** Efeitos da deservação noradrenérgica, dopaminérgica ou a combinação de ambas na expressão e desenvolvimento das LIDs.

#### 4.11.2 Desenho Experimental 2 – LIDs *versus* antagonistas $\beta$ -adrenérgicos

O desenho experimental 2 corresponde ao segundo capítulo de resultados deste trabalho. O objetivo foi avaliar os supostos efeitos antidiscinéticos dos compostos  $\beta$ -bloqueadores, propranolol e nadolol, em uma lesão não-seletiva para neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, utilizando a 6-OHDA como neurotoxina e a amantadina como controle positivo na avaliação das discinesias. As drogas foram testadas após um esquema de indução das LIDs durante uma fase crônica de tratamento com L-DOPA e o desafio com a L-DOPA após a interrupção do tratamento durante seis dias. Para isso utilizamos os seguintes grupos experimentais: veículo/L-DOPA+veículo (n=9, grupo sham - sham); 6-OHDA/L-DOPA+veículo (n=9); 6-OHDA/L-DOPA+amantadina (n=8); 6-OHDA/L-DOPA+propranolol (n=8); 6-OHDA/L-DOPA+nadolol (n=8). A dose de L-DOPA utilizada foi de 12,5

mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida, administrada pela v.o. uma vez ao dia durante 14 dias. Após a interrupção por seis dias, o tratamento com L-DOPA foi retomado no 20º dia (a contar da primeira administração de L-DOPA). O tratamento com as drogas candidatas a antidiscinéticos foi realizado nos três dias subsequentes (dias 21 - 23), sendo os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos administrados 10 min antes da L-DOPA e a amantadina 40 min antes da L-DOPA. As discinesias orofaciais, de membro e axial, assim como as pontuações com escores de rotações foram avaliadas nos dias 1, 7, 14, 20, 21 e 23 de tratamento com a L-DOPA (a cada 10 min por 2 h). Os testes para controle motor foram realizados antes de iniciar o tratamento com a L-DOPA e 1 h após a última administração de L-DOPA (23º dia), seguindo do menos aversivo para o mais aversivo deles (cilindro, campo aberto, rota-rod).



**Figura 4. Desenho Experimental 2:** Efeitos antidiscinéticos de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos sob desnervação noradrenérgica e dopaminérgica.

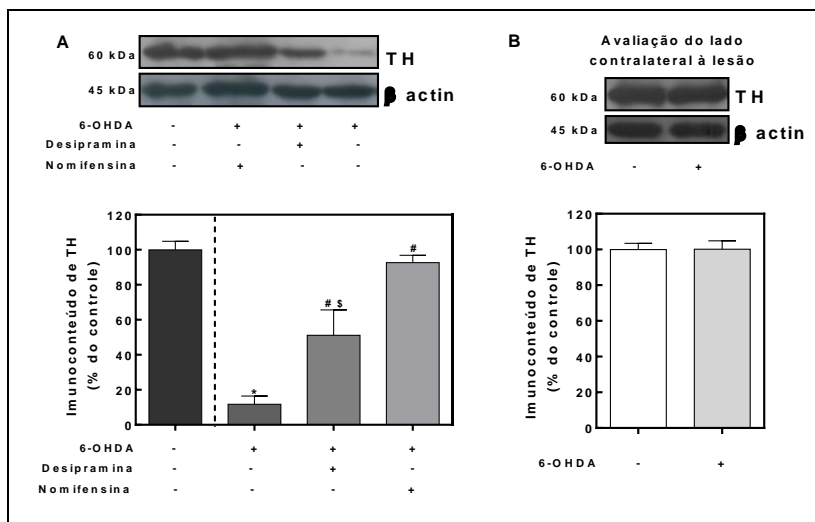




## 5 RESULTADOS (Capítulo I)

### 5.1 Análise do grau de degeneração nigroestriatal induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB e influência do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina

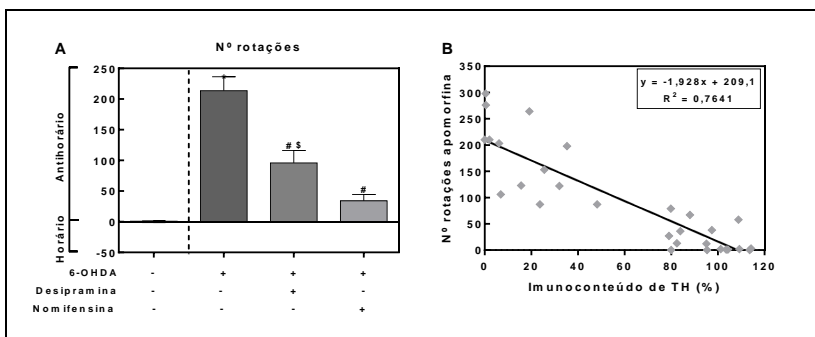
O grau de degeneração dopaminérgica foi verificado através da imunodeteção da enzima TH no estriado (Figura 5). A comparação com animais sham confirmou que a infusão de 24  $\mu$ g de 6-OHDA no MFB provocou a morte de aproximadamente 90% das células dopaminérgicas no lado ipsilateral à lesão ( $t_{0,05;8}=12,98$ ,  $P<0,001$ , Figura 5A). A ANOVA de uma via indicou que os níveis de degeneração diferem em relação ao pré-tratamento cirúrgico ( $F_{2,19}=19,91$ ,  $P<0,001$ , Figura 5A). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que todos os grupos diferem entre si; a administração prévia de desipramina (inibidor do transportador de NA), seguida da 6-OHDA, ocasiona queda por volta de 50% do conteúdo total de TH ( $P<0,01$  vs. veículo+6-OHDA); enquanto que a administração de nomifensina (inibidor da recaptação de DA) previne a redução no imunoconteúdo de TH para cerca de 90% do controle ( $P<0,01$  vs. veículo+6-OHDA e desipramina+6-OHDA). A Figura 5B ilustra que não existem diferenças nos níveis de TH no lado contralateral de animais lesionados com 6-OHDA ( $t_{0,05;8}=-0,02$ ,  $P=0,98$  vs. expressão de TH no estriado contralateral do grupo sham). O imunoconteúdo da enzima TH do grupo sham foi considerado como 100%, e os demais grupos tiveram a sua quantificação a partir da expressão total exibida pelos animais sham.



**Figura 5. Degeneração induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB direito de ratos e o efeito do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina.** A imunodeteção de TH no estriado ipsilateral de animais 6-OHDA lesionados indicou graus distintos de degeneração dopaminérgica frente à utilização de desipramina ou nomifensina (A). O imunoconteúdo de TH não reduz no lado contralateral à lesão (B). Os valores (média  $\pm$  EPM) são apresentados como porcentagem do grupo sham. Análise realizada com 8 animais em cada grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham (teste t de *Student*); # $P < 0,05$  vs. veículo+6-OHDA e \$ $P < 0,05$  vs. nomifensina/6-OHDA (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). TH - tirosina hidroxilase.

O teste de comportamento rotatório induzido por R(-)-apomorfina produziu uma média de aproximadamente 210 giros contralaterais à microinjeção de 6-OHDA nos animais hemiparkinsonianos ( $t_{0,05;8} = -9,31$ ,  $P < 0,001$  vs. sham, Figura 6A). A administração de desipramina ou nomifensina antes da lesão com 6-OHDA reduziu o número de rotações contralaterais induzidas pela administração de apomorfina ( $F_{2,20} = 22,27$ ,  $P < 0,001$ ). O número de rotações ipsilateral (sentido horário) não diferiu entre os animais sham e lesionados com 6-OHDA ( $t_{0,05;8} = 1,45$ ,  $P < 0,001$  vs. sham;  $F_{2,20} = 0,63$ ,  $P = 0,54$ ). Uma correlação linear simples demonstrou que os níveis de TH estão correlacionados com o número de rotações contralaterais à lesão no teste de rotação com apomorfina ( $F_{1,29} = 93,95$ ,  $P < 0,0001$ , Figura 6B). Esta correlação é alta ( $R^2 = 0,76$ ), onde a cada 1 unidade de porcentagem no aumento da expressão de TH temos uma

queda aproximada de 1,93 no número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina ( $y = -1,928x + 209,1$ , Figura 6B).



**Figura 6. Número de rotações contralaterais à lesão induzidas pela R(-)-apomorfina e sua correlação com o imunoconteúdo de TH.** A lesão com 6-OHDA aumentou o número de rotações anti-horárias (contralateral à lesão), enquanto as rotações no sentido horário (ipsilateral à lesão) não diferem entre os grupos (A), a porcentagem de células TH positivas apresentou correlação negativa com o número de rotações contralaterais no teste com administração de apomorfina (B). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, com 8 animais em cada grupo (A). \* $P < 0,05$  vs. sham (teste t de Student); # $P < 0,05$  vs. veículo+6-OHDA e \$ $P < 0,05$  vs. nomifensina+6-OHDA (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls); correlação linear simples realizada com o total de 32 animais;  $R^2 = 0,76$  (B). TH - tirosina hidroxilase.

## 5.2 Efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA sobre a assimetria motora de ratos hemiparkinsonianos

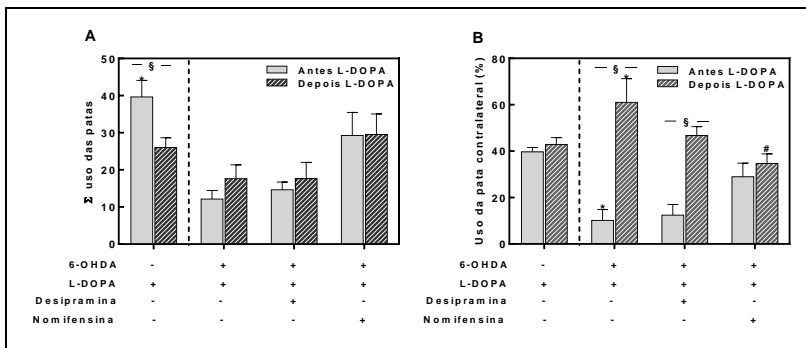
O teste do cilindro foi realizado na 3ª e 5ª semanas após administração da 6-OHDA no MFB, antes e depois do tratamento com a L-DOPA, respectivamente. A Figura 7A ilustra o somatório do uso das patas, ou seja, a soma dos atos de encostar com a pata dianteira direita, esquerda ou as duas juntas na parede do cilindro. Na Figura 7B é representada a porcentagem de utilização da pata contralateral à lesão em relação ao total de uso das patas. As análises foram realizadas a partir da ANOVA com medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, seja para avaliação do efeito da cirurgia com a 6-OHDA ou a determinação de possíveis diferenças do pré-tratamento com desipramina ou nomifensina.

Quando analisado o número total de apoios de pata na parede do cilindro (Figura 7A), evidenciamos que os animais lesionados com 6-

OHDA apresentaram uma redução global no uso dos membros anteriores em comparação aos animais controle não tratados com a L-DOPA ( $F_{1,14}=39,88$ ,  $P<0,001$ , efeito da variável cirurgia), e que após o tratamento com a L-DOPA esse prejuízo motor foi revertido, alcançando os níveis de animais não lesionados com a 6-OHDA ( $F_{1,14}=6,08$ ,  $P<0,05$ , efeito da interação entre a variável cirurgia e tempo). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no uso total das patas dianteiras do grupo sham (antes vs. depois da L-DOPA,  $P<0,05$ ). Todos os animais lesionados com 6-OHDA e previamente tratados com veículo, desipramina ou nomifensina, apresentaram o mesmo perfil de utilização global dos membros anteriores (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P>0,05$ ), independente do pré-tratamento ( $F_{2,21}=6,72$ ,  $P<0,01$ ).

Os animais do grupo veículo+6-OHDA, além da redução no uso total das patas, apresentaram uma redução significativa na utilização do membro contralateral à lesão em relação ao número global de atos de encostar (teste *post-hoc* de Newman-Keuls, sham antes L-DOPA x veículo+6-OHDA antes L-DOPA,  $P<0,01$ , Figura 7B), caracterizando a assimetria de membro anterior causada pela lesão unilateral com a 6-OHDA. Além disso, fica claro o efeito do tratamento com a L-DOPA ( $F_{1,14}=31,48$ ,  $P<0,001$ ), aumentando o uso da pata contralateral ( $F_{1,14}=24,45$ ,  $P<0,001$ ) em animais lesionados com 6-OHDA.

Em relação aos diferentes pré-tratamentos, o grupo de animais que teve a lesão antecedida pela administração de desipramina apresentou dano no uso da pata esquerda semelhante aos previamente tratados com veículo ( $F_{2,21}=0,43$ ,  $P=0,66$ ). Por outro lado, os animais previamente tratados com nomifensina apresentam uma tendência de redução no déficit de uso da pata contralateral (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P=0,07$ ) e reversão destes prejuízos após o tratamento com L-DOPA. De maneira geral, nos animais que apresentaram elevados graus de assimetria foi observada uma reversão do prejuízo motor com o tratamento com a L-DOPA ( $F_{2,21}=9,51$ ,  $P<0,01$ ).



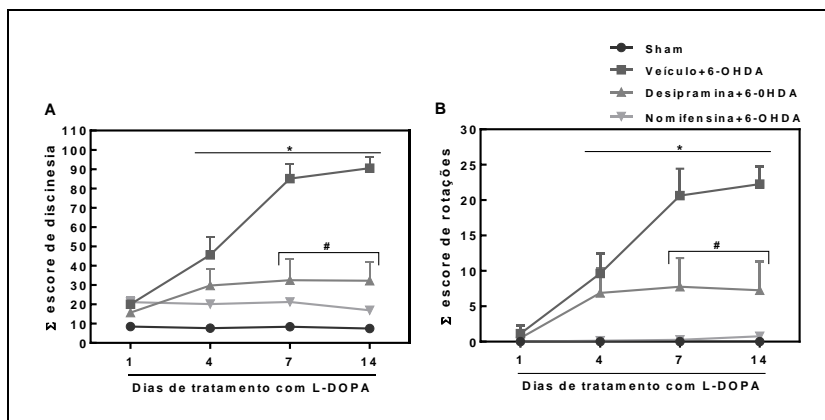
**Figura 7. Os prejuízos motores causados pela administração de 6-OHDA no MFB direito são revertidos pela L-DOPA.** A redução do uso das patas dianteiras na parede do cilindro causada pela 6-OHDA foi revertida pela L-DOPA (A), assim como a assimetria no uso da pata contralateral à lesão nos grupos com neurodegeneração previamente tratados com veículo ou desipramina, os animais nomifensina+6-OHDA apresentaram níveis semelhantes de uso da pata contralateral antes e após o tratamento com a L-DOPA (B). As porcentagens de 7B são em relação ao  $\Sigma$  de uso total das patas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. Análise realizada com 8 animais em cada grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham; § $P < 0,05$  antes vs. depois da L-DOPA; # $P < 0,05$  vs. veículo/6-OHDA (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

### 5.3 Efeitos do tratamento prévio com desipramina ou nomifensina em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA sobre as discinesias induzidas pela L-DOPA

As LIDs foram evidenciadas como uma curva crescente de severidade no decorrer dos dias de tratamento com a L-DOPA ( $F_{3,63}=34,71$ ,  $P < 0,001$ , Figura 8A), indicado pela significância estatística na ANOVA com relação ao fator repetição e a interação com os diferentes tratamento prévios ( $F_{6,63}=22,00$ ,  $P < 0,001$ ). De maneira semelhante, o escore obtido das rotações contralaterais à lesão ( $F_{3,63}=23,20$ ,  $P < 0,001$ , Figura 8B), no qual a administração repetida de L-DOPA aumentou o número de rotações no decorrer dos dias nos três grupos lesionados com 6-OHDA ( $F_{6,63}=10,27$ ,  $P < 0,001$ ).

Foram evidentes as diferenças no desenvolvimento e níveis das discinesias nos diferentes grupos avaliados. A ANOVA indicou uma diferença significativa do grupo veículo+6-OHDA em relação ao sham ( $F_{3,42}=53,125$ ,  $P < 0,001$ , Figura 8A; e  $F_{3,42}=25,81$ ,  $P < 0,001$ , Figura 8B). De fato, os animais com lesão não-seletiva (veículo+6-OHDA), noradrenérgica e dopaminérgica, apresentam maiores escores de

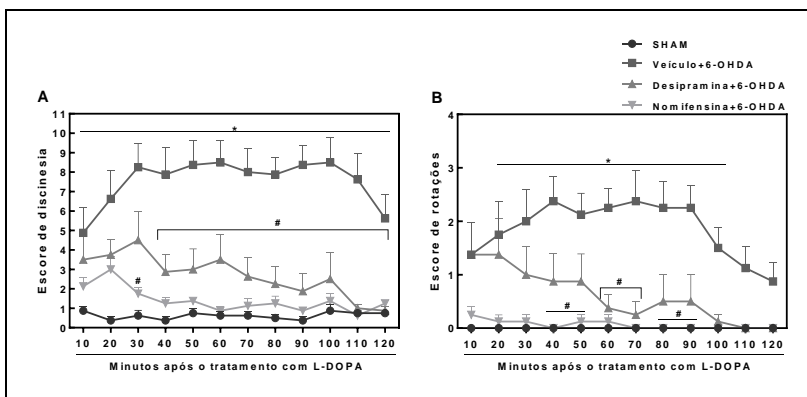
discinesias e de rotação a partir do quarto dia de tratamento com a L-DOPA ( $P < 0,05$  vs. sham). A partir do sétimo dia de administração da L-DOPA, os animais tratados previamente com desipramina e nomifensina apresentaram menores escores de discinesias e AIMs de locomoção que o grupo veículo+6-OHDA ( $P < 0,05$ , teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Adicionalmente, ambos os grupos tiveram seus escores de LIDs estabilizados a partir do sétimo dia, não havendo diferença estatística no teste *post-hoc* de Newman-Keuls ( $P > 0,05$ , D7 vs. D14 para discinesias e escore de rotações).



**Figura 8.** As discinesias de pata, axial e orolingual e os movimentos involuntários anormais de locomoção durante as duas semanas de tratamento com a L-DOPA. O tratamento com a L-DOPA durante a partir do 7º dia induziu um maior grau de discinesias nos animais do grupo veículo+6-OHDA (A) e de movimentos anormais de rotação contralateral à lesão (B). Os dados correspondem ao  $\Sigma$  de escores dos três parâmetros de discinesias durante as 12 avaliações realizadas após cada administração de L-DOPA (8A), ou o somatório dos escores de rotação (8B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8 animais por grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham, # $P < 0,05$  vs. veículo+6-OHDA (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Os colchetes indicam que ambos os grupos apresentam a diferença estatística referida (desipramina+6-OHDA e nomifensina+6-OHDA).

A avaliação temporal dos escores de LIDs e movimentos rotacionais durante os 120 min que seguem a administração de L-DOPA, após duas semanas de tratamento, pode ser observada na Figura 9. Em ambas análises, o fator tempo não foi determinante da diferença entre os animais sham e lesionados com 6-OHDA ( $F_{11,154}=0,93$ ,  $P=0,51$ , Figura

9A; e  $F_{11,154}=1,32$ ,  $P=0,22$ , Figura 9B), assim como não foi observada diferença global no fator repetição para os diferentes pré-tratamentos nas discinesias ( $F_{11,231}=1,73$ ,  $P=0,07$ , Figura 9A). Apenas a pontuação para rotação entre os tratamentos prévios apresentou influência do tempo após administração de L-DOPA ( $F_{11,231}=2,35$ ,  $P<0,01$ , Figura 9B). Em contrapartida, as variáveis “lesão com 6-OHDA” e “pré-tratamento” (respectivamente,  $F_{1,14}=188,74$ ,  $P<0,001$  e  $F_{2,21}=33,64$ ,  $P<0,001$  Figura 9A;  $F_{1,14}=79,78$ ,  $P<0,001$  e  $F_{2,21}=16,21$ ,  $P<0,001$  Figura 9B), indicaram que no decorrer das duas horas de avaliação temos diferenças evidentes na expressão de LIDs, e o teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que essas diferenças ocorrem a partir dos 10 primeiros min para veículo+6-OHDA *vs.* sham ( $P<0,05$ ) e dos 40 min para desipramina/6-OHDA ou nomifensina+6-OHDA *vs.* veículo+6-OHDA ( $P<0,05$ ).



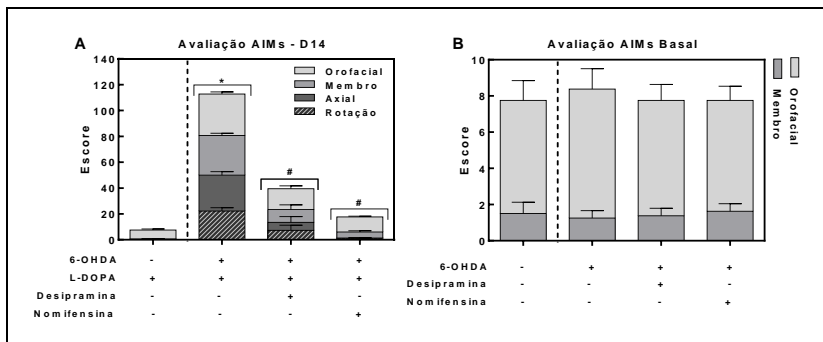
**Figura 9. Avaliação temporal dos escores de LIDs e dos movimentos involuntários anormais de locomoção após tratamento crônico com L-DOPA.** A pontuação de escore de discinesias durante 2 horas de avaliação após o décimo quarto dia de administração de L-DOPA (A) e a avaliação em intervalos de 10 min do escore de rotações sob as mesmas condições (B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8 animais por grupo. \* $P<0,05$  *vs.* sham, # $P<0,05$  *vs.* veículo+6-OHDA (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Os colchetes indicam que ambos os grupos apresentam a diferença estatística referida (desipramina+6-OHDA e nomifensina+6-OHDA).

A Figura 10A apresenta um perfil de análise mais detalhado sobre a incidência das LIDs nas 2 horas subsequentes à administração crônica da L-DOPA no 14º dia de tratamento. O teste *t* de *Student* comparou o escore de pontuação para animais do grupo veículo+6-OHDA *vs.* sham

entre cada um dos quatro parâmetros avaliados: discinesia orofacial ( $t_{0,05;8}=-13,44$ ,  $P<0,001$ ), discinesia de membro anterior ( $t_{0,05;8}=-16,05$ ,  $P<0,001$ ), distonia axial ( $t_{0,05;8}=-10,34$ ,  $P<0,001$ ) e movimentos involuntários anormais de locomoção com rotações contralaterais à lesão ( $t_{0,05;8}=-8,93$ ,  $P<0,001$ ); em todos os parâmetros o grupo veículo+6-OHDA apresentou escores significativamente mais elevados do que os animais sham. Da mesma forma, a pontuação de AIMs diferiu entre os tratamentos prévios: discinesia orofacial ( $F_{2,21}=44,16$ ,  $P<0,001$ ), discinesia de membro anterior ( $F_{2,21}=31,93$ ,  $P<0,001$ ), distonia axial ( $F_{2,21}=23,06$ ,  $P<0,001$ ) e movimentos anormais de locomoção com rotações contralaterais à lesão ( $F_{2,21}=16,20$ ,  $P<0,001$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as discinesias e os movimentos anormais de locomoção foram mais elevados nos animais previamente tratados com veículo e lesionados com 6-OHDA.

A avaliação basal realizada no 22º dia após a cirurgia com a 6-OHDA, antes da administração de L-DOPA, indicou uma baixa pontuação de escores, restringindo-se aos parâmetros de membro e orofacial (Figura 10B). A média total de pontuação dos escores, próxima a  $1\pm 2$  e  $6\pm 4$  para movimentos de membro e orofacial, respectivamente, não diferiu entre os diferentes grupos (movimentos de membro anterior contralateral:  $t_{0,05;8}=0,33$ ,  $P=0,74$  vs. sham;  $F_{2,21}=0,21$ ,  $P=0,81$  entre os tratamento prévios, e movimentos orofaciais:  $t_{0,05;8}=-0,56$ ,  $P=0,59$  vs. sham,  $F_{2,21}=0,30$ ,  $P=0,74$  entre os tratamento prévios). Por fim, não houve variação da avaliação basal de AIMs para o 14º dia de tratamento com a L-DOPA no grupo sham (membro anterior:  $t_{0,05;8}=2,19$ ,  $P=0,06$ ; orofacial:  $t_{0,05;8}=-0,74$ ,  $P=0,48$ ).

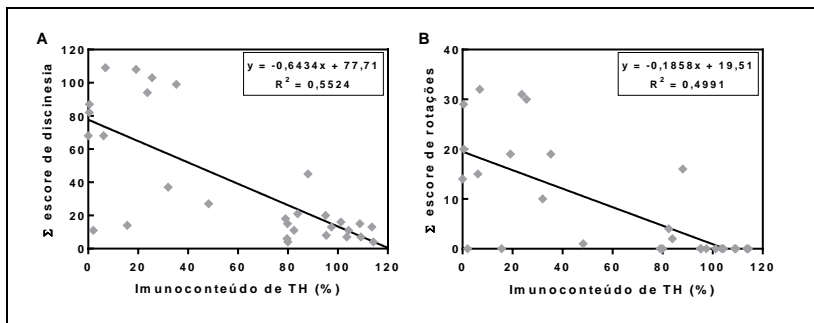




**Figura 10. Incidência de AIMs orofaciais, do membro anterior, axiais e de rotação contralateral à lesão.** A avaliação de AIMs após 14 dias de tratamento com a L-DOPA demonstra que todos os parâmetros possuem maior pontuação no grupo veículo+6-OHDA (A). Enquanto a avaliação basal, anterior ao tratamento com a L-DOPA, não apresenta diferenças significativas entre os grupos (B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8 animais por grupo. \* $P < 0,05$  vs. 6-OHDA lesionados (teste t de Student); # $P < 0,05$  vs. veículo+6-OHDA (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Os colchetes indicam que ambos os parâmetros apresentam a diferença estatística referida (AIMs orofaciais, do membro anterior, axiais e de rotação contralateral à lesão).

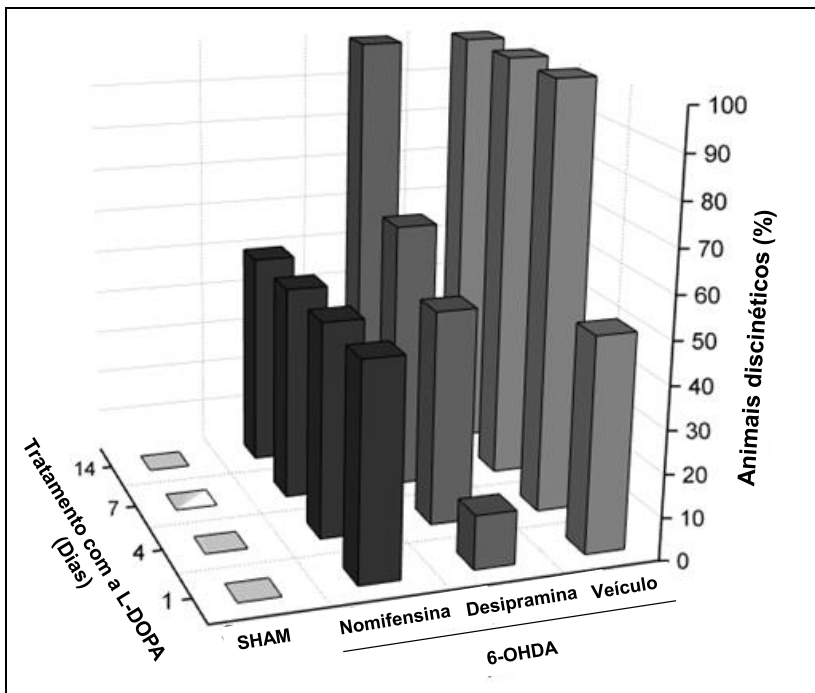
#### 5.4 Correlação entre o imunoconteúdo de TH e a severidade das LIDs e o percentual de animais que desenvolvem discinesias no decorrer do tratamento com a L-DOPA

O imunoconteúdo de TH foi correlacionado com os escores de discinesias e de locomoção durante a administração de L-DOPA. Na Figura 11 é representada a distribuição dos valores de LIDs vs. o imunoconteúdo de TH, ambos apresentaram um grau moderado de associação ( $R^2=0,55$  e  $R^2=0,50$ , respectivamente Figura 11A e 11B). A correlação entre os escores de LIDs e o imunoconteúdo de TH no estriado é negativa, ou seja, quanto menor as porcentagens de TH maior a expressão de discinesias ou movimentos involuntários anormais de locomoção ( $F_{1,29}=35,79$ ,  $P < 0,0001$ , Figura 11A;  $F_{1,29}=28,90$ ,  $P < 0,0001$ , Figura 11B). Para LIDs de membro, orofacial e de tronco, a cada 2% de queda no imunoconteúdo da enzima TH temos um aumento de aproximadamente 1 ponto no escore de pontuação de discinesias ( $y = -0,6434x + 77,71$ , Figura 11A), enquanto para o aumento de um ponto no escore de rotações é necessário uma queda, aproximada, de 6% no imunoconteúdo de TH no estriado ( $y = -0,1858x + 19,52$ , Figura 11B).



**Figura 11. Correlação linear simples entre o imunoconteúdo de TH e os escores de discinesias ou movimentos involuntários anormais de locomoção observados no décimo quarto dia de tratamento com a L-DOPA.** O grau de discinesias apresentou correlação negativa com os níveis de TH (A), assim como com os movimentos involuntários anormais de locomoção (B). Correlação linear simples realizada com o total de 32 animais ( $R^2=0,55$  e  $R^2=0,50$ , respectivamente 11A e 11B). TH - tirosina hidroxilase.

A distribuição e a prevalência de animais que desenvolveram LIDs nos diferentes grupos lesionados são ilustradas na Figura 12. O percentual de animais discinéticos foi calculado em relação ao total de animais do grupo ( $n=8$ ) para cada um dos 4 períodos de avaliação de LIDs (dias 1, 4, 7 e 14), e baseadas no critério de classificação de animais discinéticos previamente estabelecido para o modelo (repetição do escore  $\geq 2$  no intervalo de 10 min, em pelo menos um dos parâmetros de discinesias avaliados, com pontuação total  $\geq 14$  na integração das LIDs). Nenhum dos animais sham apresentou discinesias após os 14 dias de tratamento com a L-DOPA, enquanto as diferentes lesões, oriundas dos pré-tratamentos com desipramina ou nomifensina, tiveram uma distribuição desigual na porcentagem de animais discinéticos durante o tratamento crônico com a L-DOPA. Para o grupo nomifensina+6-OHDA a incidência e prevalência de animais discinéticos foi a mesma nos 4 períodos de avaliação, tendo 50% dos animais discinéticos ao final do tratamento com L-DOPA. A distribuição de casos de animais discinéticos para o grupo desipramina+6-OHDA foi progressiva (1º dia de tratamento com a L-DOPA - 12,5%, 4º dia - 50%, 7º dia - 62,5% e no 14º dia - 100%), atingindo o total de animais discinéticos na última avaliação. Enquanto 50% dos animais com lesão veículo+6-OHDA já desenvolveram discinesias com a primeira administração de L-DOPA e, a partir da segunda avaliação (4º dia de tratamento com a L-DOPA) todos os animais exibiram perfil discinético.



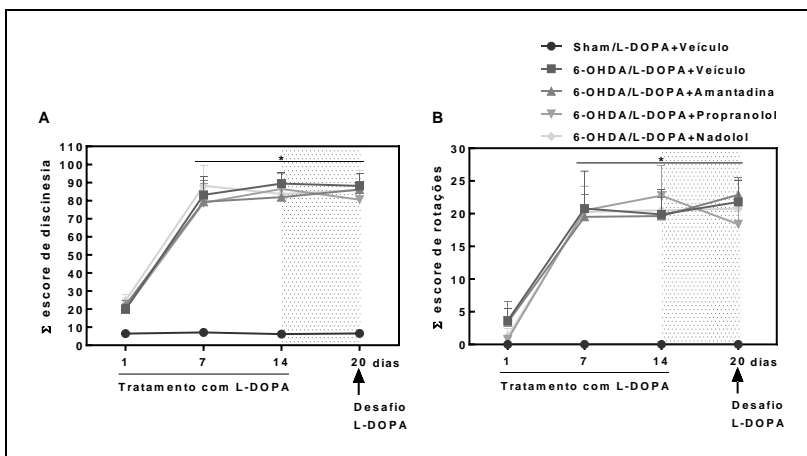
**Figura 12. Percentual de animais discinéticos durante as duas semanas de tratamento com a L-DOPA.** Perfil da porcentagem de animais discinéticos em cada um dos grupos nos dias 1, 4, 7 e 14 de tratamento com a L-DOPA. O percentual de animais discinéticos foi calculado em relação ao número total de animais de cada grupo (n=8), para cada uma das quatro avaliações.

## 6 RESULTADOS (Capítulo II)

### 6.1 Desafio farmacológico com a L-DOPA após seis dias de interrupção no tratamento de animais lesionados com a 6-OHDA

Como demonstrado no Desenho Experimental 2, após duas semanas de tratamento e estabilização das LIDs suspendeu-se o tratamento com a L-DOPA durante os 6 dias subsequentes, sendo retomado no 20º dia após a primeira administração do fármaco. A Figura 13 indica que mesmo após a interrupção do tratamento, a administração de uma única dose de L-DOPA foi capaz de gerar discinesias em níveis semelhantes aos observados no último dia de administração continuada do fármaco (grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo:  $\sum$  escore de discinesia: 89,44/88,11;  $\sum$  escore de rotações: 19,89/21,78; respectivamente, médias do décimo quarto e vigésimo dia, Figura 13A e 13B,  $P>0,05$  no teste *post-hoc* de Newman-Keuls, pós ANOVA para medidas repetidas).

Da mesma forma que os resultados apresentados no capítulo anterior, o grupo de animais lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA+veículo é estatisticamente diferente do grupo sham ( $F_{3,48}=26,15$ ,  $P<0,001$ , Figura 13A;  $F_{3,48}=4,52$ ,  $P<0,01$ , Figura 13B), o teste *post-hoc* de Newman-Keuls indica que esse perfil estende-se até o 20º dia, no desafio farmacológico com a L-DOPA ( $P<0,05$  vs. sham). Ademais, os animais que posteriormente seriam subdivididos nos grupos tratados com amantadina, propranolol e nadolol não apresentaram diferenças estatísticas do grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo até o 20º dia de avaliação, período em que passaram pelas mesmas manipulações e tratamentos ( $F_{3,29}=0,21$ ,  $P=0,89$ , Figura 13A;  $F_{3,29}=0,06$ ,  $P=0,98$ , Figura 13B).



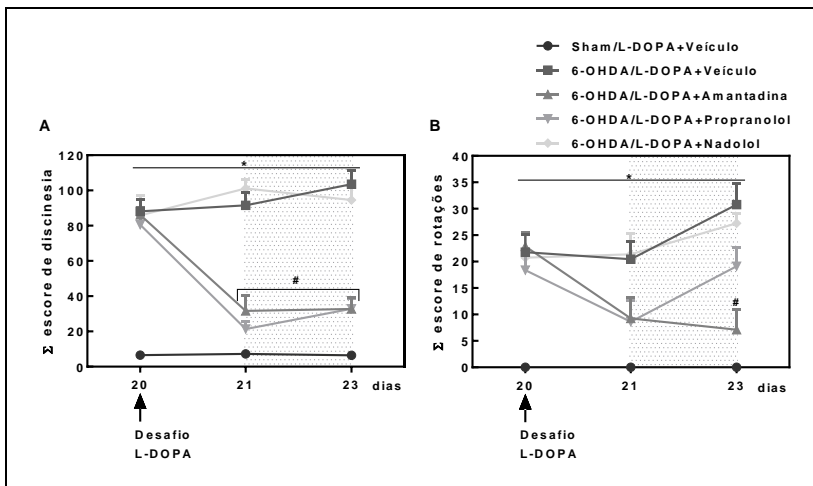
**Figura 13. Desafio com a L-DOPA após período de interrupção do tratamento.** Escore de LIDs nos dias 1, 7 e 14 de avaliação e a manutenção dos elevados níveis de discinesias no desafio com a L-DOPA após 6 dias de suspensão do tratamento (A), o mesmo perfil é demonstrado na avaliação dos escores de rotação (B). Os dados correspondem ao  $\Sigma$  de escores dos três parâmetros de discinesia (orofacial, de membro e axial) durante as 12 avaliações realizadas após cada administração de L-DOPA (13A), ou o somatório dos escores de rotação (13B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). A área hachurada corresponde ao período de interrupção no tratamento com a L-DOPA.

## 6.2 Efeito do tratamento agudo ou subcrônico com antagonistas $\beta$ -adrenérgicos nas discinesias induzidas pela L-DOPA

A manifestação das LIDs variou entre os diferentes grupos tratados ( $F_{3,29}=37,55$ ,  $P < 0,001$ , Figura 14A;  $F_{3,29}=5,83$ ,  $P < 0,01$ , Figura 14B). A administração de L-DOPA nos três dias subsequentes ao desafio (grupo 6-OHDA+L-DOPA+veículo) manteve a gravidade de movimentos involuntários anormais contralaterais à microinjeção de 6-OHDA, acometendo a musculatura axial, do membro anterior, orofacial e provocando locomoção circular ( $F_{1,16}=435,67$ ,  $P < 0,001$ , Figura 14A;  $F_{1,16}=113,18$ ,  $P < 0,001$ , Figura 14B vs. sham). A administração de propranolol, 10 min antes do desafio com L-DOPA, diminuiu a incidência de distonia axial, discinesia do membro anterior e discinesia orofacial (Figura 14A). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que essa redução foi significativa tanto no 1º quanto no 3º dia de tratamento com o propranolol ( $P < 0,05$  vs. L-DOPA para os dias 21 e 23 de avaliação),

apresentando níveis semelhantes aos do grupo tratado com amantadina (usado como controle positivo) ( $P=0,83$  e  $P=0,30$ , respectivamente). Em relação ao comportamento anormal de locomoção induzido pelo tratamento com a L-DOPA (Figura 14B), o propranolol não foi capaz de reduzir os escores de rotação observados durante as duas avaliações no período de três dias de tratamento ( $P=0,15$  e  $P=0,31$ , respectivamente). Em contraste, a amantadina promoveu uma redução gradativa nos escores de rotação, alcançando significância estatística no 3º dia de tratamento ( $p<0,05$  vs. L-DOPA).

Os animais tratados com nadolol, 10 min antes da administração de L-DOPA, apresentaram o mesmo perfil de discinesia e locomoção do grupo tratado continuamente com a L-DOPA ( $P>0,05$  vs. 6-OHDA/L-DOPA+veículo, Figura 14A, B). O aumento na pontuação de escores de rotação dos grupos 6-OHDA/L-DOPA+veículo e 6-OHDA/L-DOPA+nadolol nos dias 21 e 23 de avaliação não foi significativo (aproximadamente 15% para as discinesias e 30% para as rotações no dia 23,  $P>0,05$  no teste *post-hoc* de Newman-Keuls).



**Figura 14. Efeito do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol nas discinesias e movimentos anormais involuntários de locomoção induzidos pela L-DOPA.** O escore de discinesias após o desafio com a L-DOPA no 20º dia, e o efeito da continuidade do tratamento com a L-DOPA (6-OHDA/L-DOPA+veículo), ou a associação da L-DOPA com amantadina, propranolol ou nadolol em três dias de tratamento – avaliações no dia 21 e 23 (A), perfil semelhante é demonstrado na avaliação dos escores de rotação, para os mesmos dias de avaliação e regimes de tratamento (B). Os dados correspondem ao  $\Sigma$  de escores dos três parâmetros de discinesias (orofacial, de membro e axial) durante as 12 avaliações realizadas após cada administração de L-DOPA (14A), ou o somatório dos escores de rotação (14B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham, # $P < 0,05$  vs. 6-OHDA/L-DOPA+veículo (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). A área hachurada corresponde ao período de tratamento com L-DOPA associada ao veículo, amantadina, propranolol ou nadolol. Os colchetes indicam que ambos os grupos apresentam a diferença estatística referida (6-OHDA/L-DOPA+amantadina e 6-OHDA/L-DOPA+propranolol).

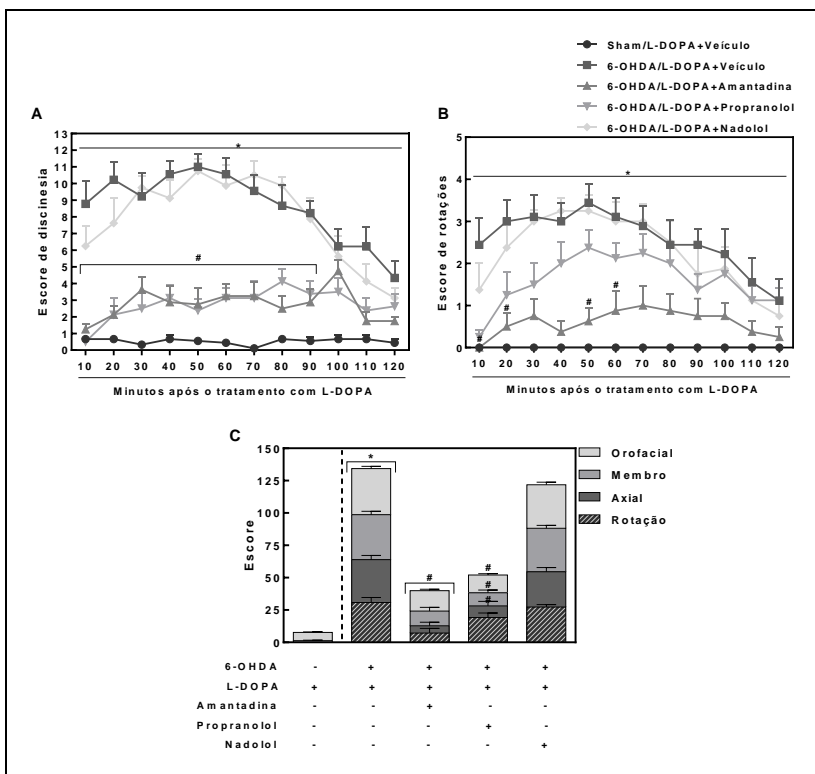
Uma análise mais detalhada sobre a duração e a incidência das LIDs nas duas horas subsequentes à administração de L-DOPA foi realizada em todos os grupos com tratamento repetido (Figura 15). Para os escores de discinesias do 23º dia após a administração de L-DOPA (Figura 15A), o grupo tratado com L-DOPA+veículo e lesionado com 6-OHDA apresentou LIDs durante as 2 horas de avaliação ( $F_{11,176}=5,04$ ,  $P < 0,001$ , ANOVA com medidas repetidas para L-DOPA vs. sham), sendo o mesmo observado para os movimentos involuntários de locomoção com

rotações contralaterais à lesão ( $F_{11,176}=2,70$ ,  $P<0,01$ , ANOVA com medidas repetidas para L-DOPA vs. sham, Figura 15B). A ANOVA com medidas repetidas para a avaliação do efeito dos tratamentos associados à administração de L-DOPA em animais lesionados com a 6-OHDA, demonstra diferenças claras no perfil das LIDs durante os 120 min de avaliação ( $F_{3,29}=31,17$ ,  $P<0,001$ , Figura 15A;  $F_{3,29}=9,46$ ,  $P<0,001$ , Figura 15B). Os escores de discinesias dos grupos 6-OHDA/L-DOPA+amantadina e 6-OHDA/L-DOPA+propranolol foram significativamente inferiores aos grupos 6-OHDA/L-DOPA+veículo nos primeiros 70 min de avaliação (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P<0,05$ , Figura 15A). Considerando os movimentos anormais de locomoção (Figura 15B), as diferenças entre os tratamentos, restringem-se às diferenças pontuais para amantadina em relação ao veículo, de animais lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P<0,05$  nos tempos de 10-20 e 50-60 min de avaliação). O grupo 6-OHDA/L-DOPA+nadolol apresentou perfil de LIDs e rotações iguais ao grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P>0,05$ ).

Resumidamente, as curvas obtidas mostraram que, o efeito da amantadina e do propranolol foi semelhante em diminuir as discinesias, cerca de 70% do somatório observado para o grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo nos 90 min após a administração da L-DOPA (Figura 15A), e somente a amantadina apresentou efetividade na redução dos escores de rotação em quatro diferentes tempos avaliados (Figura 15B).

Quanto à dissociação topográfica dos quatro parâmetros de movimentos involuntários anormais avaliados (discinesia orofacial e de membro, distonia axial e rotações contralaterais), a Figura 15C mostra que em todos os parâmetros o tratamento com a L-DOPA+veículo nos animais hemiparkinsonianos apresentou escores superiores ao grupo sham ( $p<0,05$ ), com influência do fator “lesão” ( $F_{1,16}=239,36$ ,  $P<0,001$ , orofacial;  $F_{1,16}=157,43$ ,  $P<0,001$ , membro;  $F_{1,16}=100,83$ ,  $P<0,001$ , axial;  $F_{1,16}=62,60$ ,  $P<0,001$ , rotações). Além disso, que a redução nos escores de pontuação para LIDs nos grupos amantadina e propranolol (Figuras 14 e 15), foi semelhante dentre a região topográfica afetada (face, membro, tronco), com exceção para as rotações contralaterais à lesão ( $P>0,05$ , 6-OHDA/L-DOPA+propranolol vs. 6-OHDA/L-DOPA+veículo ou nadolol).





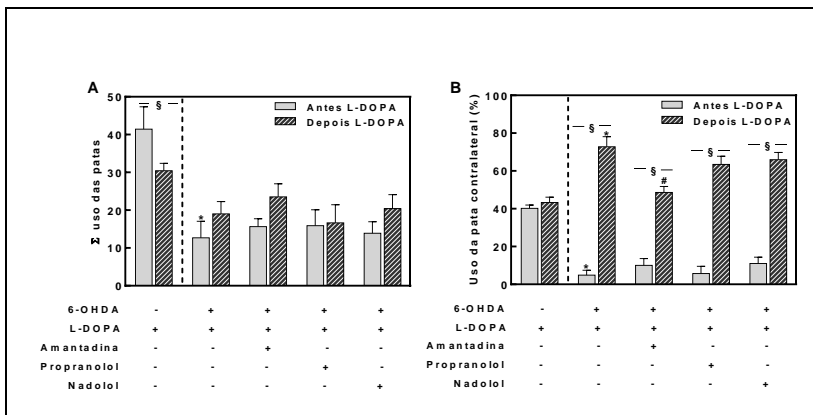
**Figura 15. Avaliação temporal e topográfica dos escores de discinesias e movimentos anormais involuntários de locomoção induzidos pela L-DOPA após o tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol.** A pontuação de escore de discinesias durante duas horas de avaliação após o terceiro dia de tratamento da associação de L-DOPA e amantadina, propranolol, nadolol e veículo em animais hemiparkinsonianos ou sham (A) e a avaliação, a cada 10 min, do escore de rotações sob as mesmas condições (B). Incidência de discinesia orofacial, discinesia do membro anterior, distonia axial e rotação contralateral à lesão sob os referidos regimes terapêuticos (C). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. Em 11A e 11B \* $P < 0,05$  vs. sham/L-DOPA+veículo (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls); em 11C \* $P < 0,05$  vs. L-DOPA (teste t de Student); # $P < 0,05$  vs. 6-OHDA/L-DOPA+veículo (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Os colchetes indicam (A) que ambos os grupos apresentaram a diferença referida (6-OHDA/L-DOPA+amantadina e 6-OHDA/L-DOPA+propranolol), (B) que a diferença referida é válida para ambos os parâmetros de AIMS avaliados.

### **6.3 Efeitos do tratamento com antagonistas $\beta$ -adrenérgicos sobre os benefícios motores da L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos**

O teste do cilindro foi realizado na 3ª e 6ª semanas após administração da 6-OHDA no MFB, antes e depois do tratamento com a L-DOPA, respectivamente. A Figura 16A apresenta o somatório do uso das patas, ou seja, a soma dos atos de encosto da pata direita, esquerda e das duas patas juntas na parede do cilindro. Na Figura 16B é representada a porcentagem de utilização da pata contralateral à lesão em relação ao total de uso das patas. As análises foram realizadas com a ANOVA com medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, seja para avaliação do efeito da cirurgia com a 6-OHDA ou determinação de possíveis diferenças dos pré-tratamentos.

Quando analisado o número total de apoios de pata na parede do cilindro (Figura 16A), evidenciamos que os animais do grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo apresentaram uma redução global no uso dos membros anteriores em comparação aos animais controle (sham/L-DOPA+veículo) não tratados com a L-DOPA ( $F_{1,16}=17,94$ ,  $P<0,001$ , efeito da variável cirurgia), e que após o tratamento com a L-DOPA esse déficit foi revertido, alcançando os níveis dos animais não lesionados com a 6-OHDA ( $F_{1,16}=6,25$ ,  $P<0,05$ , efeito da interação entre a variável cirurgia e tempo). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no uso total de patas do grupo sham (antes vs. depois da L-DOPA,  $P<0,05$ ). Todos os animais lesionados com 6-OHDA e tratados com amantadina, propranolol, nadolol ou veículo apresentaram o mesmo perfil de utilização global dos membros anteriores, tanto antes do tratamento com a L-DOPA, quanto após (teste *post-hoc* de Newman-Keuls,  $P>0,05$ ).

Os animais do grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo, além da redução no uso total das patas, apresentaram uma redução significativa no uso do membro contralateral à lesão em relação ao número total de atos de encostar (teste *post-hoc* de Newman-Keuls, sham antes L-DOPA x 6-OHDA antes L-DOPA,  $P<0,001$ , Figura 16B), caracterizando a assimetria de membro anterior consequente à lesão unilateral com a 6-OHDA. Além disso, é evidente o efeito do tratamento com a L-DOPA ( $F_{1,16}=69,49$ ,  $P<0,001$ ) em aumentar o uso da pata contralateral em animais 6-OHDA lesionados. Em relação aos diferentes tratamentos com amantadina, nadolol e propranolol, observa-se que não há diferença do perfil exibido pelo grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo ( $F_{3,29}=2,31$ ,  $P=0,09$ ).



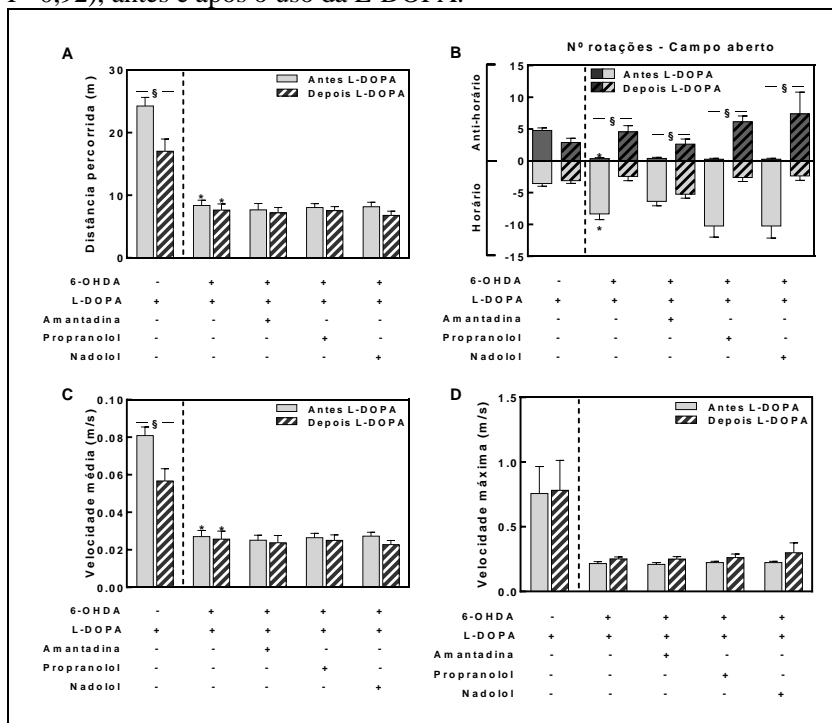
**Figura 16. Efeitos do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol sob a eficácia da L-DOPA em reduzir a assimetria no teste do cilindro.** A redução no número total de atos de encostar na parede do cilindro induzido pela 6-OHDA foi revertido pela L-DOPA (A) assim como a assimetria no uso da pata contralateral à lesão, sem prejuízo decorrente do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol (B). As porcentagens são em relação ao  $\Sigma$  de uso total das patas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. \* $P < 0,05$  vs. sham; § $P < 0,05$  antes vs. depois da L-DOPA (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No teste do campo aberto os animais do grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo exibiram uma redução nos parâmetros de distância percorrida ( $F_{1,16}=129,62$ ,  $P < 0,001$ , Figura 17A) e velocidade média ( $F_{1,16}=97,05$ ,  $P < 0,001$ , Figura 17 C) em relação ao grupo sham/L-DOPA+veículo, além disso a administração da L-DOPA não modificou esse perfil, independente do tratamento recebido após a lesão com a 6-OHDA ( $P > 0,05$ ). O grupo sham/L-DOPA+veículo apresentou uma diferença significativa no teste do campo aberto em relação a distância percorrida e velocidade média para o fator tempo, ou seja, antes ou depois da L-DOPA ( $P < 0,01$ , teste *post-hoc* de Newman-Keuls, Figura 17A e 17C).

O número de rotações horárias (ipsilateral à lesão) foi significativamente maior no grupo lesionado com 6-OHDA/L-DOPA+veículo vs. sham/L-DOPA+veículo antes do tratamento com a L-DOPA, enquanto o número de rotações no sentido anti-horário foi menor ( $F_{3,48}=17,33$ ,  $P < 0,001$ , Figura 17B). Após o tratamento com a L-DOPA, foi observada uma reversão deste quadro apresentado pelos animais lesionados ( $P < 0,001$ , teste *post-hoc* de Newman-Keuls), com número de rotações horárias e anti-horárias semelhante ao grupo sham/L-

DOPA+veículo ( $P>0,05$ , teste *post-hoc* de Newman Keuls). O mesmo perfil apresentado pelo grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo foi exibido para os demais tratamentos ( $F_{3,29}=1,23$ ,  $P=0,32$ ).

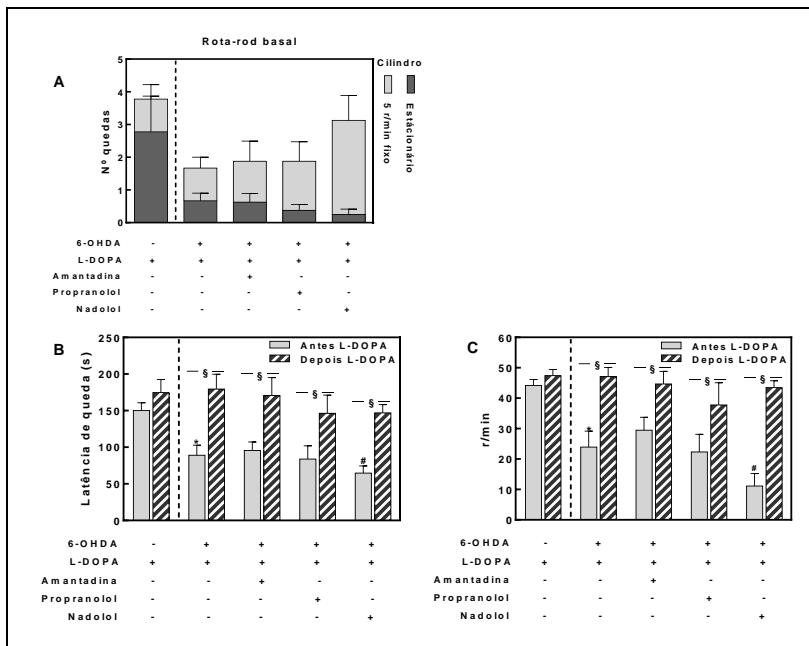
O parâmetro de velocidade máxima dos animais não sofreu alterações frente à lesão com 6-OHDA ( $F_{1,16}=0,001$ ,  $P=0,97$ , Figura 17D), assim como não foi alterado pelos diferentes tratamentos ( $F_{3,29}=0,15$ ,  $P=0,92$ ), antes e após o uso da L-DOPA.



**Figura 17. Efeitos do tratamento com L-DOPA e sua associação com amantadina, propranolol ou nadolol em animais lesionados com 6-OHDA no teste do campo aberto.** O dano na distância percorrida pelos animais lesionados não foi revertido pela L-DOPA (A). Os animais lesionados apresentaram maior número de rotações ipsilateral à lesão (sentido horário) e o tratamento com a L-DOPA foi capaz de reverter essa assimetria (B). Os animais lesionados apresentaram uma redução na velocidade média, sem modificações após o uso da L-DOPA (C). A velocidade máxima não sofreu influência nos diferentes tratamentos (D). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. \* $P<0,05$  vs. sham (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No teste do rota-rod a avaliação do período de treino não apresentou diferenças significativas no número de quedas durante a fase estacionária, assim como durante o treino com rotações fixas em 5 RPM independente do tratamento ( $P>0,05$ , Figura 18A).

O perfil exibido na avaliação de latência para queda e aceleração em RPM (Figuras 18B e 18C, respectivamente) é o mesmo. Com redução na latência para queda e RPM anterior ao tratamento com a L-DOPA no grupo 6-OHDA/L-DOPA+veículo e reversão do quadro após o tratamento com a L-DOPA ( $F_{1,16}=6,34$ ,  $P<0,05$ , Figura 18A;  $F_{1,16}=17,57$ ,  $P<0,001$ , Figura 18B). O mesmo perfil foi observado para os demais grupos de animais hemiparkinsonianos tratados com amantadina, propranolol ou nadolol, que demonstram a influência do tratamento com a L-DOPA ( $F_{1,29}=48,94$ ,  $P<0,001$ , Figura 14A;  $F_{1,29}=51,17$ ,  $P<0,001$ , Figura 14B), sem que haja diferença entre os grupos ( $F_{3,29}=1,03$ ,  $P=0,39$ , Figura 18A;  $F_{3,29}=1,54$ ,  $P=0,22$ , Figura 18B).

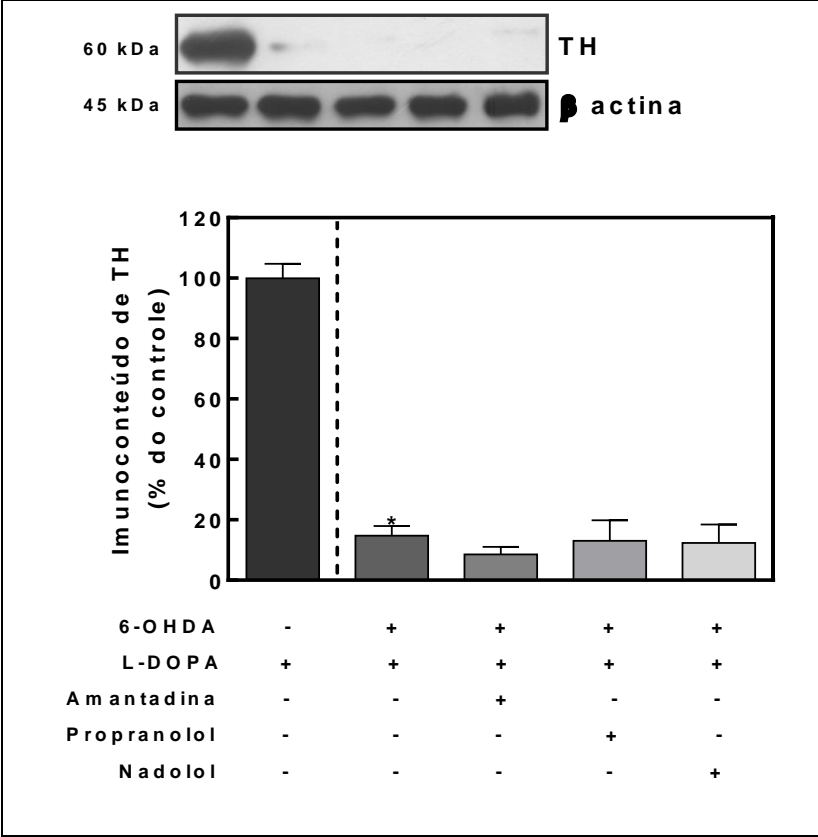


**Figura 18. Efeitos do tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol sobre a eficácia da L-DOPA em reduzir os prejuízos motores induzidos pela lesão com 6-OHDA no teste do rota-rod.** Número de quedas durante o treino, fase estacionária e com o cilindro em rotação fixa de 5 RPM (A). Os animais lesionados com 6-OHDA reverteram o prejuízo de coordenação motora e equilíbrio após o tratamento com a L-DOPA, aumentando o tempo de latência para a queda (B), assim como aumentaram o tempo de permanência sob o rota-rod acelerado (C). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM, a partir de um total de 8-9 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs. sham; §  $P < 0,05$  antes vs. depois da L-DOPA (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 6.4 Grau de degeneração da via nigroestriatal induzido por 6-OHDA e perfil do percentual de animais discinéticos no decorrer do tratamento com L-DOPA em associação à amantadina, propranolol, nadolol ou veículo

A extensão da lesão dopaminérgica foi confirmada por meio de imunodeteção da enzima TH no estriado ipsilateral dos animais lesionados com 6-OHDA (Figura 19). A comparação com animais do grupo sham/L-DOPA+veículo confirmou que a infusão de 24  $\mu$ g de 6-OHDA no MFB provocou a redução de aproximadamente 90% no

imunoconteúdo de TH ( $t_{0,05;8-9}=15,36$ ,  $P<0,001$ , 6-OHDA/L-DOPA+veículo vs. sham/L-DOPA+veículo), assim como observado no Desenho Experimental 1. A ANOVA de uma via para avaliação dos diferentes grupos lesionados com 6-OHDA (L-DOPA + amantadina, propranolol, nadolol ou veículo), indicou que os níveis de degeneração são estatisticamente semelhantes entre os grupos ( $F_{3,33}=0,31$ ,  $P=0,81$ ).

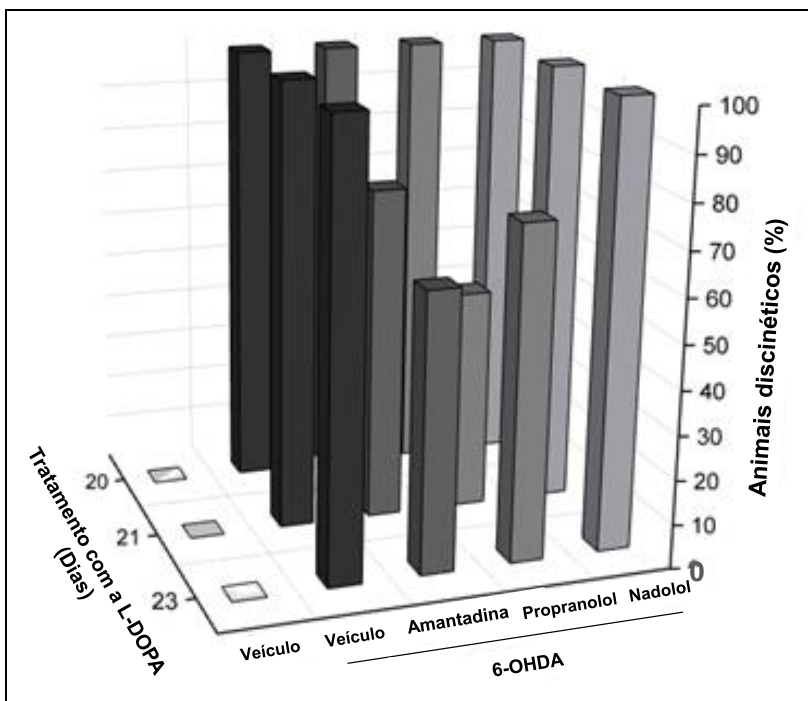


**Figura 19. Grau de degeneração dopaminérgica induzida pela microinjeção de 6-OHDA no MFB direito de ratos tratados com L-DOPA em associação à amantadina, propranolol ou nadolol.** Todos os grupos lesionados com 6-OHDA, independente do tratamento utilizado posteriormente, apresentaram redução significativa no imunoconteúdo de TH em comparação ao estriado ipsilateral de animais sham. Os valores (média  $\pm$  EPM) são apresentados como porcentagem do grupo sham (sham = 100%). Cada um dos grupos é composto por 8-9 animais. \* $P<0,05$  vs. sham (teste t de *Student*); (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, para comparação entre 6-OHDA/L-DOPA + amantadina, propranolol nadolol ou veículo). TH – tirosina hidroxilase.

Um cenário geral do potencial antiscinético dos antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, propranolol e nadolol, assim como da amantadina pode ser observado na Figura 20. O percentual de animais discinéticos foi calculado em relação ao total de animais do grupo ( $n=8-9$ ) para cada um dos 3 períodos de avaliação de LIDs (dias 20 – desafio com a L-DOPA, 21 e 23 – associação de tratamentos à L-DOPA), e foi baseado no critério de classificação de animais discinéticos citado previamente (repetição do escore  $\geq 2$  no intervalo de 10 min, em pelo menos um dos parâmetros de discinesia avaliados, com pontuação total  $\geq 14$  na integração das discinesias). Nenhum dos animais sham apresentou discinesia em qualquer um dos dias de tratamento com a L-DOPA.

Os diferentes grupos de animais lesionados com 6-OHDA partiram de um mesmo ponto basal, onde no dia de desafio com a L-DOPA (20º dia) todos os animais apresentavam-se discinéticos, nos dois dias subsequentes de avaliação houve diferenças no percentual de animais discinéticos em decorrência dos diferentes tratamentos. A continuidade do tratamento com a L-DOPA+veículo ou o esquema com administração prévia de L-DOPA+nadolol, prosseguiu com 100% dos animais classificados como discinéticos; enquanto a amantadina e o propranolol foram capazes de reverter casos de animais discinéticos tratados com L-DOPA, reduzindo essa porcentagem. Para o grupo 6-OHDA/L-DOPA+amantadina houve uma queda gradual na porcentagem de animais discinéticos (redução de 25% no dia 21, e redução de 37,5% no dia 23 de avaliação). Já o grupo 6-OHDA/L-DOPA+propranolol apresentou uma redução mais pronunciada no 1º dia, reduzindo em 50% o número de animais discinéticos no grupo, contudo, no 23º dia alcançou uma redução de 25% do total de casos avaliados no grupo.





**Figura 20.** Percentual de animais discinéticos no desafio com a L-DOPA e em dias subsequentes, que correspondem ao período de tratamento com amantadina, propranolol ou nadolol associado à L-DOPA. Perfil da porcentagem de animais discinéticos em cada um dos grupos nos dias 20, 21 e 23 de tratamento com a L-DOPA, sendo as duas últimas avaliações sob efeito dos distintos regimes terapêuticos. A porcentagem de animais discinéticos foi calculada em relação ao número total de animais de cada grupo ( $n=8-9$ ), para cada uma das três avaliações.



## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou diferentes ferramentas farmacológicas buscando investigar o envolvimento do sistema noradrenérgico nas LIDs em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA. O primeiro capítulo de resultados explora a capacidade da 6-OHDA em lesionar indistintamente neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos (UNGERSTEDT, 1968), sendo caracterizada como uma neurotoxina catecolaminérgica capaz de mimetizar sinais e sintomas da DP quando administrada em regiões cerebrais com aferências à via nigroestriatal (CURTIUS et al., 1974; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; JONSSON, 1980; LUTHMAN et al., 1989; NIKOLAUS et al., 2011), e estabelecendo-se como um modelo bastante sólido na literatura para investigação de aspectos relacionados ao parkinsonismo (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; CANNON; GREENAMYRE, 2010; TIEU, 2011).

O trabalho realizado por Braak e colaboradores (2004) foi um marco no estudo da DP, traçando o decurso temporal e espacial da doença a partir de marcadores neuropatológicos e associando os sinais e sintomas da doença aos sistemas de neurotransmissão afetados (BRAAK et al., 2004). Desde então, a influência do sistema noradrenérgico na fisiopatologia da DP vem ganhando importância na literatura científica (ALBARES et al., 2015; DELAVILLE et al., 2015; FITZGERALD, 2014; PENDOLINO et al., 2014). Vêm sendo demonstrado que o sistema noradrenérgico apresenta relações íntimas com a DP, de forma que, a visão clássica de uma doença puramente caracterizada pela extensa depleção dopaminérgica passa a ter coadjuvantes com relevância semelhante ao do seu protagonista (KALIA; BROTHIE; FOX, 2013; LANGSTON, 2006).

Nas LIDs o cenário não é diferente, sendo que estudos realizados por grupos independentes de pesquisa apontam o sistema noradrenérgico como um importante modulador dos movimentos anormais involuntários decorrentes do tratamento crônico com a L-DOPA (AL DAKHEEL; BEAULIEU-BOIRE; FOX, 2014; HUOT et al., 2013; OSTOCK et al., 2014). Apesar destas evidências, permanece comum na pesquisa pré-clínica o negligenciamento da participação do sistema noradrenérgico, fazendo-se uso de agentes (como a desipramina) que aumentam a seletividade da 6-OHDA para neurônios dopaminérgicos (BARNUM et al., 2008; PUTTERMAN et al., 2007). Esta prática desconsidera evidências clínicas importantes e pode ocultar respostas ou levar a conclusões errôneas por não mimetizarmos características patológicas

que possam ser determinantes. Neste sentido, buscou-se avaliar a importância do sistema noradrenérgico nas LIDs a partir de três diferentes protocolos cirúrgicos de administração da 6-OHDA no MFB, uma vez que o papel da NA nas discinesias perdura como tema que apresenta alto grau de discordância entre os estudos.

As ferramentas farmacológicas utilizadas nesta etapa do estudo foram a desipramina (25 mg/kg, i.p.) e a nomifensina (10 mg/kg, i.p.), que atuam modulando os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, respectivamente. A desipramina, um inibidor do transportador de NA (NAT), tem sido amplamente utilizada em modelos da DP, associada à infusão de 6-OHDA (FULCERI et al., 2006). A administração prévia de desipramina busca aumentar a seletividade da lesão causada pela 6-OHDA, caracterizando-a como um prejuízo essencialmente dopaminérgico. Em contrapartida, a nomifensina, um inibidor do transportador de DA (DAT) (LEES et al., 1984) foi proposta no presente trabalho como uma alternativa para direcionar a 6-OHDA para neurônios noradrenérgicos, nos fornecendo evidências adicionais na magnitude de importância do sistema noradrenérgico nas LIDs.

No presente estudo, a administração de 6-OHDA (8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com total de 3  $\mu\text{L}$  infundidos no MFB direito), sem a administração prévia de desipramina ou nomifensina, induziu uma redução de cerca de 90% nos níveis da enzima TH no estriado ipsilateral à lesão em comparação com animais infundidos com veículo, apresentando consistência com trabalhos prévios que demonstram elevada degeneração a partir de infusões de 6-OHDA no MFB (acima de 16  $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ ) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; LUNDBLAD et al., 2002). Além disso, foi observado que a lesão com a 6-OHDA restringe-se ao hemisfério lesionado, uma vez que o estriado contralateral de animais lesionados com 6-OHDA apresentou níveis de TH semelhantes ao controle.

A administração prévia de desipramina ou nomifensina influenciou no imunoconteúdo da enzima TH, resultando em uma redução de 50% na perda de TH para a lesão dopaminérgica e 10% para a noradrenérgica. Trabalhos prévios da literatura, utilizando ferramentas farmacológicas semelhantes do presente trabalho, demonstram que há uma desnervação noradrenérgica considerável, variando de 40 – 70% de acordo com a abordagem utilizada, 6-OHDA ou 6-OHDA+nomifensina (BARNUM et al., 2012; WINKLER et al., 2002).

Deve ser ressaltado que no presente trabalho o imunoconteúdo de TH engloba o conteúdo total do estriado ipsilateral, não havendo o panorama de resposta de suas sub-regiões de maneira individualizada ou, ainda, os níveis da enzima em outras áreas encefálicas. Além disso, a

quantificação do imunoconteúdo não implica necessariamente em funcionalidade; mecanismos adicionais podem levar, por exemplo, à sensibilização dos receptores dopaminérgicos com respostas estereotipada decorrentes da supersensibilidade pós-sinápticas, em especial quando outros fatores além da degeneração dopaminérgica estejam envolvidos (KEELER; PRETSELL; ROBBINS, 2014). Em conjunto, os resultados desta primeira parte experimental de caracterização das lesões com 6-OHDA associadas ao tratamento prévio com veículo, desipramina ou nomifensina foram considerados satisfatórios para a continuidade da investigação das LIDs em ratos hemiparkinsonianos.

A lesão unilateral com a utilização da 6-OHDA induz posturas atípicas e estereotipadas. O potencial de um modelo assimétrico de lesão é geralmente explorado a partir de desafios farmacológicos que levam a um característico comportamento rotacional. Frente à administração de agonistas dopaminérgicos, como a R(-)-apomorfina, a assimetria de orientação é mensurada pelo número de rotações contralaterais à lesão e estabelece relação direta com grau de degeneração da lesão (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

No presente estudo, o grupo 6-OHDA/veículo apresentou uma média de sete RPM, com total próximo a 210 giros durante os 30 min que seguiram a administração da R(-)-apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.). Este nível de rotações é classicamente referenciado na literatura como indicativo de uma extensa lesão em neurônios dopaminérgicos, aproximadamente 90% de redução no imunocoteúdo de TH estriatal (PRZEDBORSKI et al., 1995; UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970), condizente com queda de TH encontrada em animais lesionados com a 6-OHDA em nosso modelo. Os grupos com lesões seletivas apresentaram um número consideravelmente menor de rotações contralaterais no teste com a apomorfina (aproximadamente 100 rotações para os previamente tratados com desipramina; e 50 rotações para o grupo nomifensina). Desta forma, foi observada uma forte correlação estatística ( $R^2 > 0,70$ ) entre o número de rotações contralaterais e o imunoconteúdo de TH, demonstrando a existência de uma relação direta entre o número de rotações e o grau de desnervação dopaminérgica.

Adicionalmente, a assimetria de membros anteriores foi avaliada no teste do cilindro. Uma das vantagens deste teste é que os movimentos observados são idênticos aos normalmente realizados pelo animal em sua caixa, sendo examinados sem a manipulação do experimentador e correspondendo à capacidade natural do animal em utilizar os membros para exploração do ambiente (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

Verificou-se que todos os grupos de animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA, independente do tratamento prévio cirúrgico utilizado, apresentaram assimetria motora, com redução no uso da pata contralateral à lesão. O tratamento com a L-DOPA foi efetivo em reverter a assimetria decorrente de uma lesão unilateral com 6-OHDA, reduzindo o viés contralateral nos grupos com lesões dopaminérgicas mais robustas. Quanto à utilização total dos membros anteriores durante o período de avaliação, um déficit antecedente à terapia com o precursor dopaminérgico foi verificado e, de forma semelhante, revertido após o uso da L-DOPA. Diversos estudos corroboram com nossos achados, demonstrando a eficácia da L-DOPA na reversão de déficits motores (KIRIK et al., 2002; LINDNER et al., 1999).

Uma desvantagem desse teste refere-se à redução na atividade exploratória após exposição repetida ao ambiente de teste, o número absoluto de contatos poderá diminuir gradualmente após cada sessão, resultando em sensibilidade reduzida do teste em relação a estudos de longo prazo. No presente estudo apenas duas avaliações foram realizadas, antes e após o último dia de tratamento com a L-DOPA, seguindo como um teste efetivo para avaliação da eficácia da L-DOPA. Algo interessante e que deve ser adequadamente investigado no futuro, é o fato dos animais lesionados com 6-OHDA não sofrerem habituação no teste do cilindro, enquanto os animais falso-lesionados apresentaram uma redução significativa no total de atos de encostar na parede do cilindro. Assim, a reversão do dano no uso total das patas de animais lesionados com a 6-OHDA, pode ser, consequência de uma habituação dos animais sham e consequente redução de exploração do ambiente. De qualquer forma, o resultado da eficácia da L-DOPA em reverter a assimetria induzida pela lesão com 6-OHDA permanece com total validade, uma vez que os resultados são apresentados em porcentagem de uso do membro.

Após a validação do modelo de seletividade das lesões e controle motor com avaliação de eficácia da L-DOPA, o próximo objetivo do estudo foi determinar, de fato, a influência da desnervação noradrenérgica sobre a expressão e/ou desenvolvimento das LIDs, em contraposição à uma lesão essencialmente dopaminérgica ou a associação dos danos em ambos os sistemas de neurotransmissão. Para isso, utilizou-se um esquema de administração de L-DOPA por via oral (12,5 mg/kg, associado à uma dose fixa de 1/4 de benserazida) diariamente, durante duas semanas; com avaliação para a pontuação de LIDs durante 2 horas subsequentes ao tratamento com a L-DOPA.

O esquema terapêutico e o método de avaliação utilizados foram baseados em estudos prévios da literatura (CENCI et al., 1998;

PADOVAN-NETO et al., 2009), sendo que a reprodutibilidade do modelo foi alcançada com sucesso neste trabalho. Após o 4º dia de tratamento com L-DOPA, grande parte dos animais já se apresentavam discinéticos, com escores crescentes de severidade e estabilização da resposta no 14º dia de tratamento. Além disso, o modelo de LIDs utilizado foi efetivo em ocasionar os quatro distintos parâmetros de movimentos involuntários anormais, discinesia de membro, discinesia orofacial, distonia axial e movimentos anormais de locomoção, com rotações contralaterais à lesão.

A fim de excluir o viés de subjetividade na avaliação dos escores de LIDs, fez-se uma avaliação basal antecedente ao tratamento com a L-DOPA, os movimentos pontuados restringiram-se aos parâmetros: orofacial e de membro anterior; podendo ser característicos de comportamentos naturais do roedor (como o comportamento de autolimpeza). As pontuações atribuídas foram semelhantes em todos os grupos de animais na avaliação basal e persistiu estatisticamente igual para os animais sham até o último dia de tratamento com a L-DOPA, excluindo-se esse possível viés.

Durante o decorrer do tratamento com a L-DOPA, os grupos previamente tratados com desipramina ou nomifensina, apresentaram LIDs com escores de severidade mais brandos que os animais lesionados com 6-OHDA/veículo. Este resultado nos permite, de antemão, indicar o sistema noradrenérgico como um importante modulador das LIDs; uma vez que a partir do 7º dia de avaliação os escores de discinesias e locomoção do grupo pré-tratado com desipramina (lesão dopaminérgica), foram significativamente menores do que o grupo de animais lesionados sem a utilização do inibidor, demonstrando o potencial de uma lesão noradrenérgica em associação a dopaminérgica em agravar severamente as discinesias. A lesão com maior seletividade para neurônios noradrenérgicos, nomifensina/6-OHDA, apresentou comportamento semelhante à lesão dopaminérgica, com escores de discinesias e rotação significativamente menores do que o grupo com ambos os sistemas de neurotransmissão afetados.

Um panorama mais detalhado da trajetória de incidência de LIDs durante os 120 min de avaliação após o 14º dia de administração da L-DOPA, demonstrou que as principais diferenças entre a pontuação de escores nos distintos protocolos de lesão, restringem-se, de maneira geral, aos 60 primeiros min após o tratamento com a L-DOPA, com escores mais elevados para os animais com dupla lesão em relação aos que apresentavam dano em apenas um dos sistemas de neurotransmissão. O perfil de distribuição temporal de LIDs apresentado após a administração

de L-DOPA assemelha-se à discinesia de início de dose (THANVI et al., 2007). Em decorrência da estabilização das LIDs em alto grau de severidade, o pico de discinesia, visto como um ponto específico onde há uma maior severidade das LIDs em relação aos outros tempos, pode ser visto como uma curva contínua em decorrência de atingir-se uma gravidade elevada durante as duas horas que seguem o tratamento com a L-DOPA. Em diversos modelos e condições clínicas um “pico de discinesia” é observado em decorrência das características farmacocinéticas da L-DOPA ao atingir o “pico de dose” (BLANCHET et al., 1996).

A avaliação seriada dos subtipos de LIDs no 14º dia de tratamento com a L-DOPA, deixa claro que o aumento evidenciado no somatório dos escores para o grupo com lesão dupla é igualmente distribuído entre os quatro parâmetros avaliados (discinesia de membro, discinesia orofacial, distonia axial e rotações contralaterais). Ou seja, a contribuição dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico na incidência de cada um dos diferentes subtipos de LIDs parece ser de mesma magnitude, onde o somatório da desnervação de ambos sistemas leva a um agravamento geral de severidade, sem que haja a distinção e correlação com algum dos subtipos de movimentos involuntários anormais em especial.

É sabido que a incidência das discinesias em pacientes parkinsonianos é influenciada pela extensão da lesão dopaminérgica, dose e duração do tratamento com a L-DOPA (BLANCHET et al., 1996; RASCOL; FABRE, 2001), sendo que estes mesmos fatores influenciam o desenvolvimento das LIDs em ratos (PUTTERMAN et al., 2007) e primatas não humanos (BEZARD; DOVERO; et al., 2001). No presente trabalho também foi evidenciada uma correlação entre o imunoconteúdo de TH, como uma medida indireta de degeneração dopaminérgica, e a expressão das discinesias. Em destaque, o trabalho fornece novas evidências de que a degeneração de ambos os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico possa ser vista como um fator de risco para o desenvolvimento das LIDs.

Demonstrou-se que as discinesias parecem se correlacionar com a degeneração dopaminérgica, em fases mais tardias do tratamento crônico com a L-DOPA. No 1º dia de administração da L-DOPA, uma grande proporção de animais já se encontra discinéticos, independente do modelo de lesão utilizado, porém, não há correlação estatística entre os níveis de TH e os escores de LIDs. Ao passo que, com o decorrer do tratamento observa-se o agravamento de severidade das LIDs atingindo uma correlação moderada ( $R^2 < 0,70$ ) no 14º dia de tratamento, onde é alcançado um patamar nos escores de AIMs. Os resultados de correlação,



avaliados juntamente com o panorama de percentual de animais discinéticos durante os dias de tratamento com a L-DOPA, deixa claro que o sistema dopaminérgico não explica em sua totalidade o surgimento e o desenvolvimento das LIDs. Neste sentido, o sistema noradrenérgico demonstrou grande potencial como adjuvante para surgimento e agravamento das LIDs, apresentando resultados contundentes de que uma lesão noradrenérgica associada à dopaminérgica leve a um desenvolvimento mais ágil e severo do que a lesão dopaminérgica isoladamente.

Em relação aos trabalhos prévios da literatura que investigaram o envolvimento do sistema noradrenérgico nas LIDs, temos um cenário bastante diversificado de achados e conclusões. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, Fulceri (2007) e Miguelez e colaboradores (2011), demonstram que a presença de uma lesão noradrenérgica parece ser um fator agravante no desenvolvimento das LIDs (FULCERI et al., 2007; MIGUELEZ et al., 2011). Para Perez e colaboradores (2009), a expressão das LIDs não se altera em decorrência de uma desnervação noradrenérgica (PEREZ; SOSTI; et al., 2009). Assim como postulado por Ostock (2014), concluindo que uma lesão noradrenérgica não influencia na expressão final das LIDs, mas que, de fato, a lesão noradrenérgica somada à dopaminérgica aumentaria susceptibilidade frente a pequenas doses de L-DOPA (OSTOCK et al., 2014). Enquanto Barnum e seus colegas (2012) defendam o oposto, ou seja, que uma lesão noradrenérgica reduz a severidade das LIDs (BARNUM et al., 2012); da mesma forma que Chotibut, Fields e Salvatore demonstraram em 2014 (CHOTIBUT; FIELDS; SALVATORE, 2014).

Como visto, os resultados apresentam conclusões bastante diversificadas. Questões metodológicas e temporais podem ser a chave para essa disparidade entre os resultados, existindo muitas diferenças entre esses estudos em termos de severidade da lesão noradrenérgica e dopaminérgica, linhagem de roedor utilizada, tempos de lesão dos sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos, esquema de tratamento com a L-DOPA, modos de pontuação e avaliação das LIDs, dentre outros possíveis interferentes na metodologia de avaliação que possam levar a essa discrepância de resultados.

Apesar da inconsistência encontrada na literatura, os resultados atuais sugerem que a desnervação noradrenérgica seja, de fato, determinante para as discinesias. Desta forma, a busca por alternativas antidiscinéticas que atuem nesse sistema torna-se justificável. E assim, na segunda parte deste trabalho, investigou-se o potencial antidiscinético dos antagonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos propranolol e nadolol. Para

isso, o modelo de administração unilateral de 6-OHDA foi utilizado, lesionando ambos os sistemas, dopaminérgico e noradrenérgico.

Diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial de moduladores adrenérgicos como antidiscinéticos. Antagonistas dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, em especial  $\alpha_2$ -adrenérgico; e  $\beta$ -adrenérgicos, principalmente o propranolol; são os que apresentam um maior número de evidências em reduzir as LIDs, seja em trabalhos com a pesquisa básica experimental ou em populações de estudos clínicos (CARPENTIER et al., 1996; HENRY et al., 1999; LEWITT, 2012; LINDENBACH et al., 2011; LUNDBLAD et al., 2002; RASCOL et al., 2001). Evidências experimentais recentes também indicam que estes compostos tenham efeito antidiscinético mesmo quando há a associação de uma lesão noradrenérgica (BARNUM et al., 2012).

Um aspecto importante do tratamento a longo prazo com a L-DOPA, diz respeito ao aumento na incidência e severidade das discinesias a partir de administrações repetidas de L-DOPA. O efeito exercido a longo prazo pela L-DOPA é indicativo de alterações plásticas mal adaptadas que ocorrem no cérebro, sendo referido como o efeito "*priming*" de L-DOPA. Assim, uma vez desenvolvidas as discinesias a partir de repetidas administrações de L-DOPA, a reexposição a uma única dose, mesmo após longos períodos de interrupção do tratamento, retoma a resposta discinética em mesma magnitude (CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M., 2006).

Desta forma, a fim de mimetizar algo comumente visto na clínica, aproximando a realidade de pacientes com DP ao nosso modelo, objetivou-se avaliar a capacidade do nosso modelo de lesão unilateral com a 6-OHDA e o tratamento por duas semanas com L-DOPA - *priming*, em reproduzir as LIDs após um período de interrupção do tratamento ("*washout*"). Os resultados foram bastante claros, sendo que o desafio com a L-DOPA após interrupção do tratamento demonstrou que tanto os escores de discinesias, quanto os escores de rotações apresentaram magnitude de severidade semelhante àquelas observadas nas últimas avaliações realizadas antes da interrupção do tratamento.

Todos estes efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA refletem em uma forma de plasticidade sináptica alterada no cérebro (CENCI, 2007). Assim, pôde-se avaliar a capacidade de agentes com potencial antidiscinético em reverter ou amenizar um quadro de discinesia previamente estabelecido caracterizado por alterações duradouras e de difícil reversão.

Para a realização desta segunda etapa, utilizou-se a amantadina (40 mg/kg, i.p.) como controle positivo em nossos experimentos.

Clinicamente, o único medicamento disponível para tratamento das discinesias é a amantadina, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Todavia, as propriedades antidiscinéticas da amantadina são acompanhadas de um grande número de efeitos adversos, como confusão mental, perda de libido e alucinações (LUGINGER et al., 2000). Neste estudo, a amantadina mostrou um efeito antidiscinético sobre as LIDs tanto de forma aguda, quanto subcrônica. A magnitude de resposta que obtivemos com a amantadina como antidiscinético demonstrou ser maior que trabalhos prévios da literatura, que apontam para uma redução aproximada de 50% dos escores de pontuação de LIDs (HUOT et al., 2013; LUNDBLAD et al., 2002). Em relação às rotações contralaterais induzidas pela L-DOPA, a amantadina foi capaz de reduzir este escore somente com o tratamento subcrônico. Estudos prévios da literatura, por vezes, não demonstram a capacidade da amantadina em reduzir o escore de rotações (HUOT et al., 2013; LUNDBLAD et al., 2002). De maneira geral, um efeito antidiscinético da amantadina, comparável ao obtido neste trabalho, foi demonstrado em camundongos (LUNDBLAD et al., 2005), ratos (DEKUNDY et al., 2006; LUNDBLAD et al., 2002), macacos (BLANCHET; KONITSIOTIS; CHASE, 1998) e em pacientes parkinsonianos com LIDs (METMAN et al., 1999; STOCCHI; TAGLIATI; OLANOW, 2008).

Os principais achados deste segundo capítulo demonstram as propriedades do propranolol (20 mg/kg, i.p.) em reduzir as discinesias induzidas pela L-DOPA, com níveis de eficácia antidiscinética semelhantes aos exibidos pela amantadina. Sendo que, pela primeira vez, demonstrou-se a efetividade do propranolol em reduzir a expressão de LIDs de forma aguda e subcrônica. E ainda, sob um esquema com interrupção e retomada do tratamento com a L-DOPA, considerando-se que alterações plásticas duradouras e persistentes sejam responsáveis pela reaparição da discinesia e que, ainda assim, o propranolol possui eficácia antidiscinética.

A análise temporal do período subcrônico de tratamento, demonstrou que o propranolol foi capaz de reduzir os escores de discinesias nos primeiros 90 min após a administração da L-DOPA, equivalente à amantadina. De maneira geral, a capacidade do propranolol em amenizar a severidade de cada um dos subtipos de LIDs foi semelhante à amantadina, com exceção dos escores de locomoção. A amantadina foi efetiva em reduzir os escores de locomoção com o tratamento subcrônico, enquanto o propranolol apresentou pontuações de

escores de rotações contralaterais semelhantes aos animais lesionados que receberam L-DOPA.

Lundblad e colaboradores (2002) realizaram modificações na escala de classificação de discinesia, removendo os movimentos involuntários de locomoção, argumentando que o comportamento circular contralateral não fornece uma medida específica de discinesia (LUNDBLAD et al., 2002). O significado do comportamento de rotação contralateral em ratos hemiparkinsonianos é uma questão de debate (CENCI; WHISHAW; SCHALLERT, 2002; LANE; DUNNETT, 2008; MARIN; RODRIGUEZ-OROZ; OBESO, 2006). Tradicionalmente, no modelo animal da DP de lesão unilateral, o comportamento rotacional é considerado uma medida da atividade para compostos com potencial antiparkinsoniano. Por outro lado, a sensibilização progressiva da resposta de locomoção rotacional no tratamento crônico com a L-DOPA não deve ser totalmente desconsiderada como um indicativo de potencial discinético, uma vez que o curso de progressão das LIDs geralmente acompanha a severidade de movimentos involuntários anormais de locomoção, sugerindo que o comportamento rotacional possa ser parte das LIDs (KONITSIOTIS; TSIRONIS, 2006; MARIN et al., 2006).

No primeiro capítulo de resultados, as LIDs apresentaram grande similaridade com o perfil de rotações contralaterais, tanto em severidade dos escores, quanto no decurso temporal de surgimento e desenvolvimento, para as três diferentes lesões. Essas evidências sugerem que os movimentos involuntários anormais de locomoção possam sofrer influência dos mecanismos da LID e/ou ser classificados, de fato, como um dos subtipos de discinesia. Todavia, o grupo de resultados obtidos no segundo desenho experimental, vão contra esta ideia. Os animais tratados com propranolol apresentaram redução significativa na severidade de escores em todos os três subtipos de discinesias, para ambos os dias de avaliação; em contrapartida, o tratamento subcrônico com propranolol foi incapaz de amenizar os movimentos involuntários anormais de locomoção, sugerindo que mecanismos dissociados possam estar envolvidos nesta condição.

De fato, muitos dos compostos que efetivamente reduzem as discinesias, por vezes não alteram as rotações induzidas pela L-DOPA ou agonistas dopaminérgicos (LUNDBLAD et al., 2002), enquanto, alguns compostos com potencial antidiscinético, demonstram eficácia em também reduzir comportamento rotacional (HUOTARI et al., 2000; MIGNON; WOLF, 2002). No presente estudo, a amantadina enquadrrou-se nesse último caso, reduzindo ambos, assim como demonstrado por Karcz-Kubicha e colegas (1998) (KARCZ-KUBICHA; QUACK;

DANYSZ, 1998). Dessa forma, permanece em pauta a relação dos movimentos involuntários anormais de locomoção sendo consequência da administração de L-DOPA dissociada, ou não, aos mecanismos das discinesias.

Assim como o propranolol, o nadolol exerce seus efeitos a partir do bloqueio não-seletivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Porém o nadolol possui características estruturais e farmacocinéticas que impedem o seu acesso ao SNC, sendo seus efeitos restritos aos tecidos periféricos (BORCHARD, 1990). Desta forma, conseguimos discernir, pela primeira vez, que o propranolol exerce sua atividade antidiscinética a partir de mecanismos de ação centrais. O nadolol (20 mg/kg, i.p.) foi incapaz de reduzir os escores de LIDs, apresentando o mesmo perfil dos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA.

Buscando assegurar a eficácia da L-DOPA em amenizar os déficits motores induzidos pela lesão unilateral de 6-OHDA no MFB, fez-se o uso de três diferentes testes comportamentais motores. Para investigação da assimetria de uso das patas anteriores realizou-se o teste do cilindro, assim como na primeira etapa deste trabalho. De maneira a investigar a atividade locomotora, os animais ainda passaram pelo teste no campo aberto, e de maneira a investigar a coordenação motora e equilíbrio, utilizou-se uma das versões do rota-rod.

A L-DOPA foi capaz de reverter praticamente todos os prejuízos motores ocasionados pela lesão com a 6-OHDA. Reverteu o viés de pata contralateral e o prejuízo no uso total das patas no teste do cilindro. Assim como melhorou significativamente a coordenação motora e equilíbrio no rota-rod, aumentando a latência para queda e o tempo de permanência sob o rota-rod acelerado. A exceção é em relação ao teste do campo aberto, onde os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram uma redução na distância percorrida, velocidade média e velocidade máxima, e o tratamento com a L-DOPA foi incapaz de amenizar esses prejuízos.

Um achado interessante diz respeito ao número de rotações horárias (ipsilateral à lesão) e anti-horárias (contralateral à lesão). Quando analisados pelo software ANY-maze® verificou-se que anterior ao tratamento com a L-DOPA os animais apresentaram um número significativamente maior de rotações horárias que os animais sham, e neste parâmetro a L-DOPA demonstrou efetividade na redução dessa assimetria de orientação. Trabalhos apontam que quando o nível de lesão é extenso, os animais podem apresentar rotações espontâneas, inicialmente tendem a girar preferencialmente em direção ao lado da lesão, essa característica de assimetria postural no comportamento motor

só é vista se a desnervação é quase completa (aproximadamente 90%) (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

Alguns trabalhos colocam em pauta a atividade antidiscinética da amantadina e do propranolol visto o prejuízo em determinados testes comportamentais motores, reduzindo a eficácia da L-DOPA (HUOT et al., 2013; LUNDBLAD et al., 2002). No presente estudo, a amantadina e o propranolol apresentaram o mesmo perfil de animais lesionados tratados somente com a L-DOPA. Em nenhum dos testes comportamentais esses agentes com potencial antidiscinético demonstraram prejudicar a eficácia do tratamento com a L-DOPA. Fato importante, uma vez que uma atividade antidiscinética acompanhada de um efeito prejudicial sobre os efeitos antiparkinsonianos da L-DOPA inviabilizaria a sua utilização.

No panorama geral de percentual de animais discinéticos após o tratamento com amantadina, propranolol e nadolol, verifica-se que 100% dos animais continuaram discinéticos mesmo após o tratamento com o nadolol. Em relação à amantadina e ao propranolol, verificamos que ambos foram capazes de reverter as discinesias de alguns animais. O propranolol apresentou maior efetividade no tratamento agudo, enquanto a amantadina uma maior efetividade no tratamento subcrônico. Todavia, a porcentagem de animais discinéticos não deve ser o único indicativo de eficácia, o fato de ambos amenizarem a severidade de escores de maneira igual nos fornece informações mais seguras que o quadro global de reversão de casos discinéticos, uma vez que este baseia-se em uma classificação secundária e não ao efeito geral do quadro.

A imunodeteção de TH no estriado ipsilateral de todos os grupos de animais lesionados com 6-OHDA, independente do tratamento posterior, demonstrou uma queda de aproximadamente 90% nos níveis da enzima TH em relação aos animais sham. Esse achado valida nossos resultados comportamentais, uma vez que todos os animais partiram de um mesmo basal de degeneração e que os efeitos antidiscinéticos não estão relacionados a diferentes níveis de lesão ou efeitos neuroprotetores.

## **8 CONCLUSÃO**

O presente estudo reforça e estende a literatura indicando que o sistema noradrenérgico modula a severidade das discinesias induzidas pela L-DOPA. Os resultados apresentados neste trabalho fornecem fortes subsídios para que essa inferência possa ser feita, com a caracterização da importância de uma lesão noradrenérgica associada à dopaminérgica para o surgimento e desenvolvimento das LIDs, além de demonstrar o efeito antidiscinético de um agente modulador do sistema noradrenérgico, propranolol, em amenizar ou reverter casos de animais discinéticos.





## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. S., JR. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 6, p. 452-7, Aug 14 2009.

AGUIAR, A. S., JR. et al. Exercise attenuates levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned mice. **Neuroscience**, v. 243, p. 46-53, Jul 23 2013.

AHLSSKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 448-58, May 2001.

AL DAKHEEL, A.; BEAULIEU-BOIRE, I.; FOX, S. H. Emerging drugs for levodopa-induced dyskinesia. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 19, n. 3, p. 415-29, Sep 2014.

ALBARES, M. et al. Interaction of noradrenergic pharmacological manipulation and subthalamic stimulation on movement initiation control in Parkinson's disease. **Brain Stimul**, v. 8, n. 1, p. 27-35, Jan-Feb 2015.

ARAI, A. et al. Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. **Synapse**, v. 62, n. 8, p. 632-5, Aug 2008.

ARCOS, D. et al. Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 8, p. 1070-9, Dec 2003.

ASTON-JONES, G.; COHEN, J. D. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. **Annu Rev Neurosci**, v. 28, p. 403-50, 2005.

BARGIOTAS, P.; KONITSIOTIS, S. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: emerging treatments. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, p. 1605-1617, 10/22 2013.

BARNUM, C. J. et al. Effects of noradrenergic denervation on L-DOPA-induced dyskinesia and its treatment by alpha- and beta-adrenergic

receptor antagonists in hemiparkinsonian rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 3, p. 607-15, Jan 2012.

BARNUM, C. J. et al. Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: role for interleukin-1beta. **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 30-41, Sep 22 2008.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, Feb 1995.

BENARROCH, E. E. The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. **Neurology**, v. 73, n. 20, p. 1699-704, Nov 17 2009.

BEZARD, E.; BROTHIE, J. M.; GROSS, C. E. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 8, p. 577-88, Aug 2001.

BEZARD, E. et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6853-61, Sep 1 2001.

BHIDE, N. et al. Effects of the beta-adrenergic receptor antagonist Propranolol on dyskinesia and L-DOPA-induced striatal DA efflux in the hemi-parkinsonian rat. **J Neurochem**, v. 134, n. 2, p. 222-32, Jul 2015.

BLANCHET, P. J. et al. Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. **Can J Neurol Sci**, v. 23, n. 3, p. 189-93, Aug 1996.

BLANCHET, P. J.; KONITSIOTIS, S.; CHASE, T. N. Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. **Mov Disord**, v. 13, n. 5, p. 798-802, Sep 1998.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J**, v. 279, n. 7, p. 1156-66, Apr 2012.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14 Suppl 2, p. S124-9, 2008.

BORCHARD, U. Pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking agents: clinical significance of hepatic and/or renal clearance. **Clin Physiol Biochem**, v. 8 Suppl 2, p. 28-34, 1990.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, n. 20, p. 1916-25, May 13 2008.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-34, Oct 2004.

BUCK, K.; FERGER, B. Comparison of intrastriatal administration of noradrenaline and L-DOPA on dyskinetic movements: a bilateral reverse in vivo microdialysis study in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 16-20, Mar 3 2009.

\_\_\_\_\_. The selective alpha1 adrenoceptor antagonist HEAT reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Synapse**, v. 64, n. 2, p. 117-26, Feb 2010.

BURCH, D.; SHEERIN, F. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 365, n. 9459, p. 622-7, Feb 12-18 2005.

CAILLE, S. et al. Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus ceruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, n. 2, p. 881-92, Aug 1999.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 1022-30, Aug 2014.

CALLONI, G. W. et al. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 141-5, Jan 1 2005.

CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. **Prog Brain Res**, v. 184, p. 17-33, 2010.

CARPENTIER, A. F. et al. Improvement of levodopa-induced dyskinesia by propranolol in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 46, n. 6, p. 1548-51, Jun 1996.

CENCI, M. A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 236-43, May 2007.

CENCI, M. A.; LEE, C. S.; BJORKLUND, A. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. **Eur J Neurosci**, v. 10, n. 8, p. 2694-706, Aug 1998.

CENCI, M. A.; LINDGREN, H. S. Advances in understanding L-DOPA-induced dyskinesia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, n. 6, p. 665-71, Dec 2007.

CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neurochem**, v. 99, n. 2, p. 381-92, Oct 2006.

CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 2, p. 381-392, 2006.

CENCI, M. A.; WHISHAW, I. Q.; SCHALLERT, T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 7, p. 574-9, Jul 2002.

CHAPUIS, S. et al. Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. **Mov Disord**, v. 20, n. 2, p. 224-30, Feb 2005.

CHIN-CHAN, M.; NAVARRO-YEPES, J.; QUINTANILLA-VEGA, B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 124, 2015.

CHINTA, S. J. et al. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? **J Intern Med**, v. 273, n. 5, p. 429-36, May 2013.

CHOTIBUT, T.; FIELDS, V.; SALVATORE, M. F. Norepinephrine transporter inhibition with desipramine exacerbates L-DOPA-induced dyskinesia: role for synaptic dopamine regulation in denervated nigrostriatal terminals. **Mol Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 675-85, Dec 2014.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 6, p. 359-66, Jun 2011.

COOKSON, M. R. Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 9, p. a009415, Sep 2012.

CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

CORDOVA, F. M. et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res**, v. 998, n. 1, p. 65-72, Feb 13 2004.

CORTI, O.; LESAGE, S.; BRICE, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1161-218, Oct 2011.

CURTIUS, H. C. et al. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. **J Chromatogr**, v. 99, n. 0, p. 529-40, Nov 6 1974.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p. 525-35, Jun 2006.

DEKUNDY, A. et al. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. **Behav Brain Res**, v. 179, n. 1, p. 76-89, Apr 16 2007.

DEKUNDY, A. et al. Effects of group I metabotropic glutamate receptors blockade in experimental models of Parkinson's disease. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 3, p. 318-26, Apr 14 2006.

DELAVILLE, C.; DEURWAERDERE, P. D.; BENAZZOUZ, A. Noradrenaline and Parkinson's disease. **Front Syst Neurosci**, v. 5, p. 31, 2011.

DELAVILLE, C. et al. Subthalamic nucleus activity in the awake hemiparkinsonian rat: relationships with motor and cognitive networks. **J Neurosci**, v. 35, n. 17, p. 6918-30, Apr 29 2015.

DELAVILLE, C.; NAVAILLES, S.; BENAZZOUZ, A. Effects of noradrenaline and serotonin depletions on the neuronal activity of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata in experimental parkinsonism. **Neuroscience**, v. 202, p. 424-33, Jan 27 2012.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol**, v. 175, n. 2, p. 303-17, Jun 2002.

EVERSE, J.; COATES, P. W. Role of peroxidases in Parkinson disease: a hypothesis. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 10, p. 1296-310, May 15 2005.

FAHN, S.; PARKINSON STUDY, G. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? **J Neurol**, v. 252 Suppl 4, p. IV37-IV42, Oct 2005.

FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **Cleve Clin J Med**, v. 79, n. 1, p. 28-35, Jan 2012.

FITZGERALD, P. J. Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of Parkinson's disease? **Med Hypotheses**, v. 82, n. 4, p. 462-9, Apr 2014.

FULCERI, F. et al. Abnormal involuntary movements (AIMs) following pulsatile dopaminergic stimulation: severe deterioration and morphological correlates following the loss of locus coeruleus neurons. **Brain Res**, v. 1135, n. 1, p. 219-29, Mar 2 2007.

FULCERI, F. et al. Nigrostriatal damage with 6-OHDA: validation of routinely applied procedures. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1074, p. 344-8, Aug 2006.

GAZEWOOD, J. D.; RICHARDS, D. R.; CLEBAK, K. Parkinson disease: an update. **Am Fam Physician**, v. 87, n. 4, p. 267-73, Feb 15 2013.

GIROUX, M. L. Parkinson disease: managing a complex, progressive disease at all stages. **Cleve Clin J Med**, v. 74, n. 5, p. 313-4, 317-8, 320-2 passim, May 2007.

GLOWINSKI, J.; IVERSEN, L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. **J Neurochem**, v. 13, n. 8, p. 655-69, Aug 1966.

GOBERT, A. et al. Quantification and pharmacological characterization of dialysate levels of noradrenaline in the striatum of freely-moving rats: release from adrenergic terminals and modulation by alpha2-autoreceptors. **J Neurosci Methods**, v. 140, n. 1-2, p. 141-52, Dec 30 2004.

GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 54, p. 141-64, 2014.

GOMEZ-MANCILLA, B.; BEDARD, P. J. Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. **Clin Neuropharmacol**, v. 16, n. 5, p. 418-27, Oct 1993.

GOSHIMA, Y. et al. Nanomolar L-dopa facilitates release of dopamine via presynaptic beta-adrenoceptors: comparative studies on the actions in striatal slices from control and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mice, an animal model for Parkinson's disease. **Jpn J Pharmacol**, v. 55, n. 1, p. 93-100, Jan 1991.

GOSHIMA, Y. et al. Picomolar concentrations of L-dopa stereoselectively potentiate activities of presynaptic beta-adrenoceptors to facilitate the release of endogenous noradrenaline from rat hypothalamic slices. **Neurosci Lett**, v. 129, n. 2, p. 214-6, Aug 19 1991.

GOUR, J. et al. Movement patterns of peak-dose levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. **Brain Res Bull**, v. 74, n. 1-3, p. 66-74, Sep 14 2007.

GRENHOFF, J.; SVENSSON, T. H. Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. **Eur J Pharmacol**, v. 233, n. 1, p. 79-84, Mar 16 1993.

GUERRERO, E. et al. Recent advances in alpha-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 2, p. 525-36, Apr 2013.

HARA, M. et al. Role of adrenoceptors in the regulation of dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons. **J Neurochem**, v. 113, n. 4, p. 1046-59, May 2010.

HARRO, J. et al. Effect of denervation of the locus coeruleus projections by DSP-4 treatment on [3H]-raclopride binding to dopamine D(2) receptors and D(2) receptor-G protein interaction in the rat striatum. **Brain Res**, v. 976, n. 2, p. 209-16, Jun 27 2003.

HENRY, B. et al. The alpha2-adrenergic receptor antagonist idazoxan reduces dyskinesia and enhances anti-parkinsonian actions of L-dopa in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 14, n. 5, p. 744-53, Sep 1999.

HIRSCH, E. C. et al. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 10 Suppl, p. S78-85, Oct 2000.

HORN, S. DRUG-INDUCED MOVEMENT DISORDERS. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 10, n. 3, Movement Disorders, p. 142-153, 2004.

HUOT, P. et al. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 1, p. 171-222, Jan 2013.



HUOTARI, M. et al. Effects of histamine H(3)-ligands on the levodopa-induced turning behavior of hemiparkinsonian rats. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 6, n. 3, p. 159-164, Jul 1 2000.

JIANG, C. et al. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 27, n. 2, p. 63-73, Mar-Apr 2004.

JONSSON, G. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. **Annu Rev Neurosci**, v. 3, p. 169-87, 1980.

KALIA, L. V.; BROTHIE, J. M.; FOX, S. H. Novel nondopaminergic targets for motor features of Parkinson's disease: review of recent trials. **Mov Disord**, v. 28, n. 2, p. 131-44, Feb 2013.

KARCZ-KUBICHA, M.; QUACK, G.; DANYSZ, W. Amantadine attenuates response alterations resulting from repetitive L-DOPA treatment in rats. **J Neural Transm**, v. 105, n. 10-12, p. 1229-36, 1998.

KATZENSCHLAGER, R. et al. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD003735, 2003.

KEELER, J. F.; PRETSELL, D. O.; ROBBINS, T. W. Functional implications of dopamine D1 vs. D2 receptors: A 'prepare and select' model of the striatal direct vs. indirect pathways. **Neuroscience**, v. 282C, p. 156-175, Jul 22 2014.

KIRIK, D. et al. Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 7, p. 4708-13, Apr 2 2002.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp Neurol**, v. 152, n. 2, p. 259-77, Aug 1998.

KOBILKA, B. K. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 4, p. 213-8, Apr 2011.

KONITSIOTIS, S.; TSIRONIS, C. Levodopa-induced dyskinesia and rotational behavior in hemiparkinsonian rats: independent features or components of the same phenomenon? **Behav Brain Res**, v. 170, n. 2, p. 337-41, Jun 30 2006.

LANDRIGAN, P. J. et al. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 9, p. 1230-3, Sep 2005.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 303-12, Aug 2008.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann Neurol**, v. 59, n. 4, p. 591-6, Apr 2006.

LATEGAN, A. J.; MARIEN, M. R.; COLPAERT, F. C. Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbens and caudate nucleus as determined by intracerebral microdialysis. **Brain Res**, v. 523, n. 1, p. 134-8, Jul 16 1990.

\_\_\_\_\_. Suppression of nigrostriatal and mesolimbic dopamine release in vivo following noradrenaline depletion by DSP-4: a microdialysis study. **Life Sci**, v. 50, n. 14, p. 995-9, 1992.

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 178, n. 1, p. 44-51, Jan 1 2002.

LEES, G. J. et al. Effect of nomifensine on the toxicity of 6-hydroxydopamine for mesotelencephalic dopamine neurons. **Brain Res**, v. 308, n. 1, p. 155-8, Aug 6 1984.

LEWITT, P. A. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. **Transl Neurodegener**, v. 1, n. 1, p. 4, 2012.

\_\_\_\_\_. New levodopa therapeutic strategies. **Parkinsonism Relat Disord**, Sep 8 2015.

LINDENBACH, D. et al. Behavioral and cellular modulation of L-DOPA-induced dyskinesia by beta-adrenoceptor blockade in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 337, n. 3, p. 755-65, Jun 2011.

LINDGREN, H. S. et al. The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 1, p. 150-9, Feb 12 2007.

LINDNER, M. D. et al. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behav Brain Res**, v. 102, n. 1-2, p. 1-16, Jul 1999.

LIPRANDO, L. A. et al. Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. **Synapse**, v. 52, n. 4, p. 233-44, Jun 15 2004.

LOPES, M. W. et al. Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 87, p. 22-33, Aug 2015.

LUGINGER, E. et al. Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 15, n. 5, p. 873-8, Sep 2000.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 120-32, Jan 2002.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. **Exp Neurol**, v. 194, n. 1, p. 66-75, Jul 2005.

LUTHMAN, J. et al. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behav Brain Res**, v. 33, n. 3, p. 267-77, Jul 1 1989.

MABANDLA, M. V.; RUSSELL, V. A. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. **Behav Brain Res**, v. 211, n. 1, p. 16-22, Jul 29 2010.

MAIER HOEHN, M. M. Parkinsonism treated with levodopa: progression and mortality. **J Neural Transm Suppl**, v. 19, p. 253-64, 1983.

MARIN, C.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; OBESO, J. A. Motor complications in Parkinson's disease and the clinical significance of rotational behavior in the rat: have we wasted our time? **Exp Neurol**, v. 197, n. 2, p. 269-74, Feb 2006.

MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. **Lancet**, v. 1, n. 8007, p. 345-9, Feb 12 1977.

MATHEUS, F. C. et al. Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Mol Neurobiol**, Jul 12 2015.

MCCORMICK, D. A.; PAPE, H. C.; WILLIAMSON, A. Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system. **Prog Brain Res**, v. 88, p. 293-305, 1991.

MEITZEN, J. et al. beta1-Adrenergic receptors activate two distinct signaling pathways in striatal neurons. **J Neurochem**, v. 116, n. 6, p. 984-95, Mar 2011.

METMAN, L. V. et al. Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. **Arch Neurol**, v. 56, n. 11, p. 1383-6, Nov 1999.

MIGNON, L.; WOLF, W. A. Postsynaptic 5-HT(1A) receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, n. 1, p. 85-94, Aug 2002.

MIGUELEZ, C. et al. The locus coeruleus is directly implicated in L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats: an electrophysiological and behavioural study. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24679, 2011.

MOLINOFF, P. B.; AXELROD, J. Biochemistry of catecholamines. **Annu Rev Biochem**, v. 40, p. 465-500, 1971.

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Validation of the l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists. **Brain Res Bull**, v. 68, n. 1-2, p. 16-23, Dec 15 2005.

NAMBU, A.; TOKUNO, H.; TAKADA, M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. **Neuroscience Research**, v. 43, n. 2, p. 111-117, 6// 2002.

NIKOLAUS, S. et al. In vivo imaging neurotransmitter function. The rat 6-hydroxydopamine model and its relevance for human Parkinson's disease. **Nuklearmedizin**, v. 50, n. 4, p. 155-66, 2011.

OBESO, J. A. et al. The globus pallidus pars externa and Parkinson's disease. Ready for prime time? **Exp Neurol**, v. 202, n. 1, p. 1-7, Nov 2006.

OLIVEIRA, C. S. et al. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, May-Jun 2008.

OSSIG, C.; REICHMANN, H. Treatment strategies in early and advanced Parkinson disease. **Neurol Clin**, v. 33, n. 1, p. 19-37, Feb 2015.

OSTOCK, C. Y. et al. Effects of noradrenergic denervation by anti-DBH-saporin on behavioral responsivity to L-DOPA in the hemi-parkinsonian rat. **Behav Brain Res**, v. 270, p. 75-85, Aug 15 2014.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 927-35, Mar 31 2009.

PENDOLINO, V. et al. l-DOPA reverses the impairment of Dentate Gyrus LTD in experimental parkinsonism via beta-adrenergic receptors. **Exp Neurol**, v. 261, p. 377-85, Nov 2014.

PEREZ, V. et al. Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA-lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances. **J Neural Transm**, v. 116, n. 10, p. 1257-66, Oct 2009.

PEREZ, V. et al. Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats. **J Neural Transm**, v. 116, n. 7, p. 867-74, Jul 2009.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977.

PIFL, C.; KISH, S. J.; HORNYKIEWICZ, O. Thalamic noradrenaline in Parkinson's disease: deficits suggest role in motor and non-motor symptoms. **Mov Disord**, v. 27, n. 13, p. 1618-24, Nov 2012.

POSSER, T. et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 6, p. 407-14, Jun 2007.

PREDIGER, R. et al. Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. In: KOSTRZEWA, R. M. (Ed.). **Handbook of Neurotoxicity**: Springer New York, 2014. cap. 7, p.753-788. ISBN 978-1-4614-5835-7.

PRZEDBORSKI, S. et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, n. 3, p. 631-47, Aug 1995.

PUTTERMAN, D. B. et al. Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, n. 1, p. 277-84, Oct 2007.

RASCOL, O. et al. Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 16, n. 4, p. 708-13, Jul 2001.

RASCOL, O.; FABRE, N. Dyskinesia: L-dopa-induced and tardive dyskinesia. **Clin Neuropharmacol**, v. 24, n. 6, p. 313-23, Nov-Dec 2001.

RASCOL, O. et al. Cortical motor overactivation in parkinsonian patients with L-dopa-induced peak-dose dyskinesia. **Brain**, v. 121 ( Pt 3), p. 527-33, Mar 1998.

ROSS, R. A.; REIS, D. J. Effects of lesions of locus coeruleus on regional distribution of dopamine-beta-hydroxylase activity in rat brain. **Brain Res**, v. 73, n. 1, p. 161-6, Jun 14 1974.

SCHAEFFER, E.; PILOTTO, A.; BERG, D. Pharmacological Strategies for the Management of Levodopa-Induced Dyskinesia in Patients with Parkinson's Disease. **CNS Drugs**, v. 28, n. 12, p. 1155-1184, 2014/12/01 2014.

SCHANK, J. R. et al. Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2221-30, Oct 2006.

SCHAPIRA, A. H. et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 10, p. 845-54, Oct 2006.

SCHRAG, A.; QUINN, N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. **Brain**, v. 123 ( Pt 11), p. 2297-305, Nov 2000.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol**, v. 50, n. 2-3, p. 275-331, Oct 1996.

SCHWARTZ, M.; SABETAY, S. An approach to the continuous dopaminergic stimulation in Parkinson's disease. **Isr Med Assoc J**, v. 14, n. 3, p. 175-9, Mar 2012.

STOCCHI, F.; TAGLIATI, M.; OLANOW, C. W. Treatment of levodopa-induced motor complications. **Mov Disord**, v. 23 Suppl 3, p. S599-612, 2008.

TAJIRI, N. et al. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Res**, v. 1310, p. 200-7, Jan 15 2010.

THANVI, B.; LO, N.; ROBINSON, T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. **Postgrad Med J**, v. 83, n. 980, p. 384-8, Jun 2007.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a009316, Sep 2011.

UDENFRIEND, S.; CREVELING, C. R. Localization of dopamine-beta-oxidase in brain. **J Neurochem**, v. 4, p. 350-2, Oct 1959.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 107-10, Dec 1968.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res**, v. 24, n. 3, p. 485-93, Dec 18 1970.

VITEK, J. L.; GIROUX, M. Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. **Ann Neurol**, v. 47, n. 4 Suppl 1, p. S131-40, Apr 2000.

WINKLER, C. et al. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiol Dis**, v. 10, n. 2, p. 165-86, Jul 2002.

YACOUBIAN, T. A.; STANDAERT, D. G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 7, p. 676-87, Jul 2009.

YAVICH, L. et al. Alpha2-adrenergic control of dopamine overflow and metabolism in mouse striatum. **Eur J Pharmacol**, v. 339, n. 2-3, p. 113-9, Nov 27 1997.

YAVICH, L. et al. Atipamezole, an alpha2-adrenoceptor antagonist, augments the effects of L-DOPA on evoked dopamine release in rat striatum. **Eur J Pharmacol**, v. 462, n. 1-3, p. 83-9, Feb 21 2003.



ZAROW, C. et al. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. **Arch Neurol**, v. 60, n. 3, p. 337-41, Mar 2003.